



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología

**Evolución del complejo de especies *Bostryx modestus*
basado en el gen de la Citocromo C oxidase subunidad
I del genoma mitocondrial**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Bachiller en Genética y
Biotecnología

AUTOR

Ana Luz CHUMBE MENDOZA

ASESOR

Dra. Rina Lastenia RAMÍREZ MESÍAS

Lima, Perú

2009



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Chumbe, A. (2009). *Evolución del complejo de especies Bostryx modestus basado en el gen de la Citocromo C oxidase subunidad I del genoma mitocondrial*. [Tesis de bachiller, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

RESUMEN

El desierto costero del Perú alberga diversidad de especies de moluscos terrestres, los que conservan en su genoma toda una historia de cambios ambientales. Al evaluar genéticamente especies de distribución restringida en este tipo de escenarios se podría inferir su desarrollo histórico. *Bostryx* es uno de los géneros más ampliamente distribuidos en el occidente peruano; tres especies de este género conforman el llamado complejo de especies *Bostryx modestus*, que incluye a *Bostryx modestus*, *Bostryx sordidus* y *Bostryx scalariformis*, principalmente distribuidos en el ecosistema de Lomas. Con la finalidad de dilucidar las relaciones evolutivas de este complejo y asignar posibles perfiles COI a las mencionadas especies, se usó el marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI), marcador estrella en el desarrollo del código de barras de la vida. Se usaron 21 ejemplares de *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*, de diferentes zonas de Lima, además de ejemplares de *B. conspersus*, *B. turritus* y *Scutalus* spp. como grupo externo. Se obtuvo DNA total de tejido muscular del pie (2 mm³) de dichos individuos. Posterior a estandarizar la amplificación de COI en estas especies endémicas de la costa peruana, se procedió a la amplificación y secuenciación de las mismas. Las 29 secuencias obtenidas colapsaron en 19 haplotipos, uno de los cuales fue compartido por tres individuos de *Bostryx sordidus* y un *Bostryx modestus* (srStmd). Los demás haplotipos fueron únicos por especie, incluyendo un haplotipo muy divergente de *Bostryx modestus* de las Lomas de Picapiedra (mdPiL). La hipótesis evolutiva estimada por cuatro metodologías distintas: Neighbor-joining (NJ), Máxima Parsimonia (MP), Máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*, ML) e Inferencia Bayesiana (IB), mostró una topología similar en todos los casos con 13 de los 14 ejemplares de *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis* formando un grupo monofilético; dentro de este clado no se encontraron grupos monofiléticos por especie, impidiendo la obtención de perfiles COI. El tiempo de divergencia estimado para las especies *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis* resultó en el Pleistoceno (1.382 millones de años), época de grandes ciclos glaciales e interglaciales. La diversidad genética actual del grupo genera una topología de “árbol en estrella”, marca indiscutible de un modelo demográfico de cuello de botella genético seguido de súbita expansión demográfica, demostrando que el desierto peruano ha pasado por periodos de exuberancia producidos probablemente por paleo eventos El Niño/Oscilación Sur. El marcador COI no consiguió definir los límites de las especies *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*, generando un árbol polifilético debido a diversificación reciente más que a la carencia de sensibilidad de este marcador. La costa peruana se muestra como un ambiente generador de diversidad biológica que merece ser preservado, para conservar la salud del ecosistema.

ABSTRACT

The Peruvian coastal desert hosts a diversity of land snail species, which store in their genomes a whole history of environmental changes. Genetic evaluation of species of restricted geographical distribution in these scenarios leads us to infer their historical development. *Bostryx* is one of the most widely distributed genera in the western Peruvian; three species of that genus are forming the so called *Bostryx modestus* species complex, which includes *B. modestus*, *B. sordidus* and *B. scalariformis*, mainly distributed in Lomas ecosystems. In order to find the evolutionary relationships among those species and to assign barcodes to those species, the cytochrome C oxidase I (COI), a brilliant marker in the development of barcodes, was used. There were used 21 specimens corresponding to *B. modestus*, *B. sordidus* and *B. scalariformis*, coming from several places near to Lima; other specimens belonging to *B. conspersus*, *B. turritus* and *Scutalus*, were used as outgroup. Total DNA was obtained from foot muscle tissue (2 mm³) of these specimens. After standardization of COI protocols for PCR amplification in these peruvian coast endemic species, amplification and sequencing for all individuals was done. The 29 sequences obtained collapsed in 19 haplotypes, one of which was shared by three *Bostryx sordidus* specimens and a *Bostryx modestus* one (srStmd). The other haplotypes were unique by species, including a very divergent *Bostryx modestus* haplotype from Lomas de Picapiedra (mdPiL). The evolutionary hypothesis estimated by four different methodologies: Neighbor-joining (NJ), Maximum parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (*Inferencia Bayesiana*, IB) showed a similar topology in all cases, with 13 out of 14 haplotypes of the *B. modestus* complex (*B. modestus*, *B. sordidus* and *B. scalariformis*) forming a monophyletic group; inside this clade there were not found monophyletic groups per species, preventing the formation of COI profiles. The estimated divergence time for the species *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis* was placed in the Pleistocene (1.382 million years), time of great glacial and interglacial cycles. The actual genetic diversity found generates a phylogenetic tree with a star topology, indisputable signature of a bottle neck demographic model followed by sudden demographic expansion, showing that the Peruvian desert has gone through periods of abundance, probably as a result of El Niño/Southern Oscillation paleo-events. The COI marker failed to define the limits of species among *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*, finding a polyphyletic tree, generated by a recent diversification rather than a lack of sensitivity of this marker. Thus, the Peruvian coast is still working as a generator of biological diversity that deserves to be preserved, to conserve the health of the ecosystem.

I. INTRODUCCIÓN

A. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La orogénesis de los Andes sucedió a finales del eoceno hasta el mioceno-plioceno hace 1.8 millones de años (Ma), produciéndose muchos cambios climáticos. Especiaciones ocurridas a causa de dichas formaciones serían relativamente jóvenes (Coltrinari, 1993). En el mioceno medio se dio origen, a la par de tales cambios climáticos, a las formaciones hiperáridas (Mortimer, 1973), en éstas se distribuyen actualmente las formaciones conocidas como “Lomas” (Dillon, 1997).

Uno de los ecosistemas más complejos que existe en el mundo son las “Lomas”. Se encuentran distribuidas en las costas de Perú y Chile. Estos ecosistemas se muestran exuberantes estacionalmente durante los meses de invierno debido a la humedad traída por las neblinas formadas por la evaporación del agua de mar cerca de las costas. La baja temperatura del mar del Pacífico hace que las precipitaciones se presenten de manera suave en forma de garúas, dotando a estos ecosistemas de un tipo único de biota (Weyrauch & Coronado, 1958; Ono, 1986; Rundel et al., 1990). Sin embargo, dicha estacionalidad es alterada por eventos ENSO (El Niño/Oscilación Sur) (Pinche, 1994; Ramírez et al., 2003).

Estimaciones sobre la flora total existente dan un número cercano a 1000 especies con tan sólo 68 especies compartidas entre Perú y Chile (Dillon, 1997), convirtiendo así a cada ecosistema como único en su género. Tal abundancia proporciona el soporte necesario para comunidades altamente endémicas de mamíferos, aves, insectos y moluscos terrestres principalmente (Weyrauch & Coronado, 1958; Aguilar & Arrarte, 1974; Aguilar, 1985). Las especies más representativas de moluscos terrestres que se encuentran actualmente son *Bostryx aguilari*, *Bostryx conspersus*, *Bostryx modestus*, *Bostryx sordidus*, *Bostryx scalariformis*, *Succinea peruviana*, *Scutalus proteus* y *Scutalus versicolor*, presentándose también en algunos casos la cosmopolita *Helix aspersa*. En el caso de *B. sordidus*, ella extiende su presencia hasta valles interandinos (Ramírez et al., 2003). Diferente es el caso de *Bostryx turritus*, que presenta abundancia reducida en Lomas, no siendo así en valles interandinos cercanos a la ciudad de Lima (Ramírez, 2004). Éstas, especialmente *Scutalus* spp., así como animales marinos formaron parte de la dieta de pobladores peruanos prehispánicos (Engel, 1970; 1987).

Entre todas las especies de moluscos terrestres que se presentan en Lomas, tres de éstas (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*), presentan ciertas similitudes en tamaño y

diseño de sus conchillas, incluso en su morfología interna. En cuanto a su distribución, hasta el momento no se ha reconocido plenamente que existan en simpatria. Al hacer el análisis a nivel molecular con el marcador 16S rRNA, los haplotipos no se asociaron por especie, mas si llegaron a asociarse entre ellos (Ramírez, 2004). Tal resultado llevó a denominar a este conjunto de especies como el complejo *Bostryx modestus* [Ramírez, 2004].

Desde épocas ancestrales los naturalistas han tratado de descubrir, describir y explicar la diversidad en el mundo biológico, este esfuerzo es conocido como sistemática. Inicialmente independiente de la teoría evolutiva, en décadas posteriores pasó a asimilar criterios más objetivos y mediante computadoras analizar grandes cantidades de información. Desde la década de 1960 - 1970 en adelante, con el desarrollo de la biología molecular, biólogos evolucionistas empezaron a utilizar estructuras proteínicas y secuencias de DNA para reconstruir relaciones filogenéticas, explicarnos modelos evolutivos y los procesos que éstos involucran (Hillis et al., 1996). Sin embargo, existen algunos casos en los que el uso de un adecuado marcador, la combinación de algunos o la longitud del mismo será decisivo para la reconstrucción de una filogenia (Avice et al., 1987; 2000; 2004).

La revolución en genómica está proveyendo a biólogos evolucionistas de múltiples caracteres, elementos para la reconstrucción del árbol de la vida (Bonett et al., 2004). Las secuencias del DNA mitocondrial son muy utilizadas en la reconstrucción de relaciones evolutivas entre animales que divergieron recientemente, y son los marcadores de especie y género más ampliamente utilizados durante la última década (Avice, 2000; Bonett et al., 2004). Tiene además un rol central en estudios de evolución, biodiversidad y estudios conservacionistas. Un DNA mitocondrial típico contiene 37 genes y ofrece ventajas, tales como adecuada velocidad de mutación, ausencia de recombinación y relativa facilidad en amplificaciones por PCR (Avice, 1987; 2000; 2004).

El Convenio sobre Diversidad Biológica firmado en 1992 postula tres objetivos principales: (1) La conservación de la biodiversidad, (2) El uso sostenible de los componentes de la diversidad biológica y (3) La participación justa y equitativa en los beneficios derivados del uso de los recursos genéticos. En su artículo 7º, se destaca el compromiso de los países participantes en relación a la identificación, monitoreo, mantenimiento y organización de los componentes de la diversidad biológica en particular para los propósitos de conservación y uso sustentable (www.cbd.int/doc/legal/cbd-un-en.pdf). Es dentro de este marco que surge el "El Consorcio para el Código de Barras de la

Vida” (CBOL, de sus siglas en inglés *Consortium for the Barcode of Life* (www.barcoding.si.edu).

CBOL representa un esfuerzo conjunto de más de 150 organizaciones miembros entre museos, universidades, organizaciones conservacionistas, organizaciones gubernamentales y compañías privadas en más de 150 países de diferentes partes del mundo, intenta establecer el gen de la Citocromo C oxidasa subunidad I (COI) del genoma mitocondrial como una región de código de barras (*barcode*) para todos los grupos de animales superiores.

Este proyecto expone sus razones en 10 ítems, los que involucran la factibilidad de trabajar con fragmentos de especímenes morfológicamente irreconocibles o incluso en estado de descomposición. Asimismo, permite reconocer organismos sin importar el estadio en el que se encuentren, huevo o larva. Permite además el reconocimiento de especies miméticas, en algunos casos invasoras o perjudiciales para determinados ecosistemas. También, facilitar el reconocimiento rápido de nuevas especies, desarrollando para ello, en el futuro, una guía de mano. Por otro lado, democratizar el acceso mediante una base de datos, que a futuro podría acceder a una enciclopedia de la vida en la tierra, facilitando el acceso público al conocimiento biológico. Así como también, valorizar las colecciones de museos y herbarios y finalmente, mostrar nuevas ramas en “el árbol de la vida”. Sin embargo, el uso de COI también presenta limitaciones en la resolución de especies que han divergido recientemente, así como en grupos que presentan baja diversidad de secuencias, como es el caso del phylum Cnidaria (Stoeckle *et al.*, 2005).

Así, el código de barras de DNA se presenta como una nueva y apasionante metodología empleada principalmente en investigación taxonómica. Al ser el *barcode* una secuencia estándar de DNA de un gen establecido provee una manera de identificar especímenes. El objetivo es crear una biblioteca de nuevos conocimientos sobre diversidad de especies para finalmente llegar a comparar el *barcode* de cualquier especie no identificada con una referencia existente de *barcode* y encontrar la especie a la que pertenece esta muestra problema o las especies más relacionadas. Este hecho dejaría de limitar la identificación de especímenes a los taxónomos (www.dnabarcodes.org).

Si bien el *barcode* ha tenido hasta el momento prioridad en la identificación de especies de interés científico, económico o social, actualmente el CBOL está creando alianzas y proyectos con diferentes entidades gubernamentales y no gubernamentales en todo el mundo para concretar su misión en el menor tiempo posible.

La conservación y el desarrollo descansan en el conocimiento de la biodiversidad. La diversidad biológica de cada país constituye un recurso natural valioso y vulnerable. Muestrear, identificar y estudiar tal diversidad está entre los primeros pasos hacia su protección y beneficio (www.barcoding.si.edu/PDF/CBOL-ABS%20Brochure%20-%20FINAL.pdf).

Empleando el marcador mitocondrial COI se pretende llegar a vislumbrar las relaciones evolutivas entre las especies del complejo *Bostryx modestus* (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*) evaluando también la utilidad del mismo en la función que se le ha asignado como marcador de identidad de las especies animales (Hebert et al., 2003a).

B. JUSTIFICACIÓN

Cada especie extinta conlleva a una pérdida de algo más que únicamente un genoma, involucra además modificación de las interacciones existentes en dicha comunidad alterando la formación existente (Lidicker, 1995), en este caso las Lomas. Desde la explosión demográfica en el Perú, estos ecosistemas están amenazados con desaparecer y con ello el número de especies en la comunidad, las proporciones en que se encuentran, así como sus relaciones, que en algunos casos son necesarias para la supervivencia de especies (Ramírez et al., 2001). Siendo los caracoles pulmonados habitantes característicos de Lomas y además excelente material para estudiar respuestas evolutivas (Gould, 1969), se propone realizar la reconstrucción filogenética de *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis* mediante el análisis de la Citocromo c Oxidasa subunidad I en estas tres especies endémicas diferenciables por sus conchas pero que al ser analizadas con el marcador mitocondrial 16S rRNA no consiguieron formar grupos monofiléticos y que actualmente no se las conoce coexistiendo en simpatría. Además, se podrá testar la eficiencia del uso de COI como “Código de Barras”, lo que asimismo proveerá de mejores pautas para que los tomadores de decisiones puedan definir prioridades de conservación de estos hábitats tan vulnerables.

OBJETIVOS

C.1. OBJETIVO GENERAL

Dilucidar las relaciones evolutivas del complejo de especies endémicas *Bostryx modestus* (Mollusca Gastropoda, Orthalicidae) considerando para ello el marcador

mitocondrial Citocromo C Oxidasa subunidad I (COI), actualmente usado como gen marcador en el desarrollo del proyecto internacional *Barcode of Life*.

C.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ℵ Obtener secuencias COI del complejo de especies *Bostryx modestus*: *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*.
- ℵ Obtener secuencias COI de otras especies de la familia Orthalicidae a ser usado como grupo externo.
- ℵ Reconocer y caracterizar los haplotipos de las secuencias COI obtenidas.
- ℵ Definir posibles perfiles COI para las especies *B. modestus*, *B. sordidus*, *B. scalariformis*.
- ℵ Reconstruir la filogenia de las especies que constituyen el complejo *B. modestus*, sobre la base de los haplotipos del marcador mitocondrial COI.

II. ANTECEDENTES

Los desiertos se caracterizan por la baja diversidad y alto grado de endemismo, resultantes de pronunciadas barreras climáticas y biológicas. El desierto de Perú es poseedor de un clima, una vegetación y topografía característicos (Rundel *et al.*, 1990). Forma una banda angosta con una extensión de 2000 km (5°-18°S), cubriendo 140,000 km² (11%) del territorio peruano (Dillon, 1997). Los Andes de sudamérica y los ambientes adyacentes, pueden evaluarse con referencia a los patrones y procesos que caracterizan la diversidad, evolución, y distribución de sus plantas. Si bien existe una complejidad ecológica desconcertante y la historia evolutiva y geológica es poco entendida, se puede progresar por medio del estudio de las relaciones de los procesos conocidos y los paleoeventos con patrones de diversificación y distribución (Young *et al.*, 2002).

Los patrones de la diversidad de plantas se pueden cuantificar e ilustrar en mapas para permitir el estudio de los enlaces con los parámetros medioambientales y con los procesos pasados de especiación y extinción (Young *et al.*, 2002), análogamente, debido a su baja vagilidad¹, podrían trabajarse especies de moluscos terrestres. La identificación geográfica del origen de las especies es un paso importante hacia el entendimiento de los cambios evolutivos a través del tiempo y del espacio. Un mapeo geográfico de caracteres en una reconstrucción filogenética bien resuelta, inferiría la localización del ancestro común más reciente (Dean & Ballard, 2004).

Durante la década pasada se han desarrollado metodologías que han permitido investigar patrones moleculares en relación a modelos evolutivos y sus procesos, sumadas a técnicas probadas como son electroforesis de aloenzimas y citogenética (White, 1973 y Lewontin, 1974 *apud* Hillis *et al.*, 1996; Avise, 2004).

Estudios de filogenias se han aplicado en casi todas las disciplinas de la biología, y los investigadores de biología evolutiva reconocen y aprecian las bondades de los métodos filogenéticos para interpretar todo tipo de procesos y patrones biológicos. Además, novedosos métodos de análisis pueden relacionar hipótesis filogenéticas probando así hipótesis relacionadas a biogeografía, ecología, etología, desarrollo, epidemiología, cubriendo casi todos los aspectos de la biología (Hillis *et al.*, 1996).

Los estudios de filogenética molecular buscan encontrar relaciones evolutivas entre diferentes organismos. Desde sus inicios en los años 1960's a raíz del secuenciamiento de

¹ Rapidez con que una población vagante reacciona ante las presiones demográficas en el sitio con su capacidad innata de dispersarse, evitando así el hacinamiento y la congestión.

proteínas, pasando por el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa han resultado en una explosión sin precedentes en este ámbito de estudio (Li, 1997).

Al usar secuencias de DNA para estimaciones filogenéticas en lugar de datos morfológicos o fisiológicos, se cuenta con datos que evolucionan de manera más regular, así como con datos más susceptibles a tratamientos matemáticos y/o estadísticos además de abundantes (Li, 1997). La información que pueden brindar los genomas está en muchos casos en relación a la utilidad que éstos posean para un objetivo definido.

Para estudios de relaciones intra e interespecíficas el DNA mitocondrial es poseedor de características especiales, como son velocidad de cambio mayor al DNA nuclear, herencia uniparental, entre otros (Avice, 1987; 2004).

Rodríguez-Robles *et al.* (2001) utilizaron 783 pares de bases (pb) que abarcaban una porción del extremo terminal 3' del gen *Ndh4* y dos genes de ARNt, con lo que diferenciaron dos subespecies de *Charina bottae*, una serpiente cilíndrica de color uniforme habitante de áreas herbáceas y pinares, correspondiente a las zonas norte y sur de EE.UU. En el 2006, Tripodi *et al.* utilizaron un segmento de 428 pb del gen mitocondrial 16S rRNA, lo que les permitió caracterizar dos nuevas especies del género *Reticulitermes*, polillas más comunes en norteamérica. La divergencia del complejo *Carinarion* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) evidenciado mediante DNA mitocondrial, mostró cinco haplogrupos, no observados en DNA nuclear ni en aloenzimas polimórficas, probando al 16S rRNA como un reloj molecular acelerado para este caso (Geenen *et al.*, 2006).

En cuanto a estudios de COI implicados en reconstrucciones filogenéticas para moluscos en particular, se encuentran varias referencias. Por ejemplo, Holland & Hadfield (2002) lograron definir unidades de significancia evolutiva para propósitos de conservación de *Achatinella mustelina*; Rundell *et al.* (2004) obtuvieron una buena resolución para 13 especies de succineidos de Hawai y seis de otras islas del pacífico y Japón, empleando la secuencia COI de 663 pb. Gittenberger & Gittenberger (2006) describieron la radiación de especies del género *Leptoconchus* habitantes de coral (Scleractinia), con el marcador mitocondrial COI que permitió la identificación de 14 especies nuevas, lo que no se había conseguido basándose en caracteres de la conchilla; las ornamentaciones y la escultura de las conchillas constituían caracteres de diagnóstico parcial, debido al *overlapping* interespecífico de caracteres y a una amplia plasticidad fenotípica de dichos caracteres.

Los métodos de clasificación y nomenclatura de organismos actualmente están basados en el sistema taxonómico desarrollado por Linnaeus hace 250 años, los que en su mayoría están basados en apreciaciones morfológicas. Apoyados en características morfológicas se ha conseguido describir únicamente 20% de toda la vida eucariota. Por ello, en la taxonomía moderna se considera además estudios de hospederos, etológicos, biológicos, geográficos, y por supuesto, genéticos. En setiembre del 2003 se realizó la conferencia “Taxonomy, DNA and the Barcode of Life”; se proponía la identificación de 10 millones de especies eucariotas de la tierra mediante una corta secuencia mitocondrial (100 pb-650 pb) del gen de la Citocromo C oxidasa subunidad I (COI), mediante un proceso rápido y poco costoso (Stoeckle et al., 2003). Pensada inicialmente para cumplir objetivos taxonómicos, rápidamente se entendió el poder de dicha propuesta; cualquiera en cualquier lugar y en cualquier época tendría la posibilidad de identificar rápida y exactamente a partir de especímenes en cualquier condición (Stoeckle et al., 2005).

El marcador COI en filogenias de gastrópodos ha sido usado ampliamente con éxito. En la presente tesis se intentó reconstruir la filogenia del complejo de especies *B. modestus* en base a dicho marcador.

Las especies del complejo *B. modestus* (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*) conspicuos representantes de las Lomas de la costa central de Perú, se muestran con marcadas diferencias morfológicas intraespecíficas y también interespecíficas. Sin embargo, el análisis filogenético con el marcador 16S rRNA no logró definirlos claramente por especie, debido probablemente a su reciente (Ramírez, 2004).

En América del sur, la coevolución entre las especies de plantas y animales es fuente de complejidad adicional. La influencia humana sobre estos patrones y procesos es poco entendida, pero ha afectado y continuará influenciando la composición, la diversidad, y la geografía de la biota sudamericana (Young et al., 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

El material biológico a ser utilizado procede de diferentes Lomas ubicadas en el Departamento de Lima y en la Provincia de Lima, entre los 11° 38' 36,2" y 12° 11' 42.19" latitud Sur y entre los 77° 29' 23.93" y 76° 39' 22.87" longitud Oeste. En la **Figura 1** se muestran las localidades visitadas durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

El área de estudio se extiende a las localidades de:

- ✧ Salinas de Huacho (Departamento de Lima, Provincia de Huaura, Distrito de Huacho)
- ✧ Lomas de Pasamayo (Departamento de Lima, Provincia de Huaral, Distrito de Aucallama)
- ✧ Lomas de Iguanil (Departamento de Lima, Provincia de Huaral, Distrito de Huaral)
- ✧ Pampas del cerro El Agua (Km 115 – Panamericana Norte) (Departamento de Lima, Provincia de Huaura, Distrito de Huacho)
- ✧ Lomas de Atocongo (Provincia de Lima, Distrito de Villa María del Triunfo.)
- ✧ Lomas del Paraíso (Provincia de Lima, Distrito de Villa María del Triunfo.)
- ✧ Lomas de Picapiedra (Provincia de Lima, Distrito de Pachacamac.)
- ✧ Lomas de El Manzano (Provincia de Lima, Distrito de Pachacamac.)
- ✧ Lomas de Carabayllo (Provincia de Lima, Distrito de Carabayllo)
- ✧ Valle de Santa Eulalia (Departamento de Lima, Provincia de Huarochirí, Distrito de San Eulalia.)

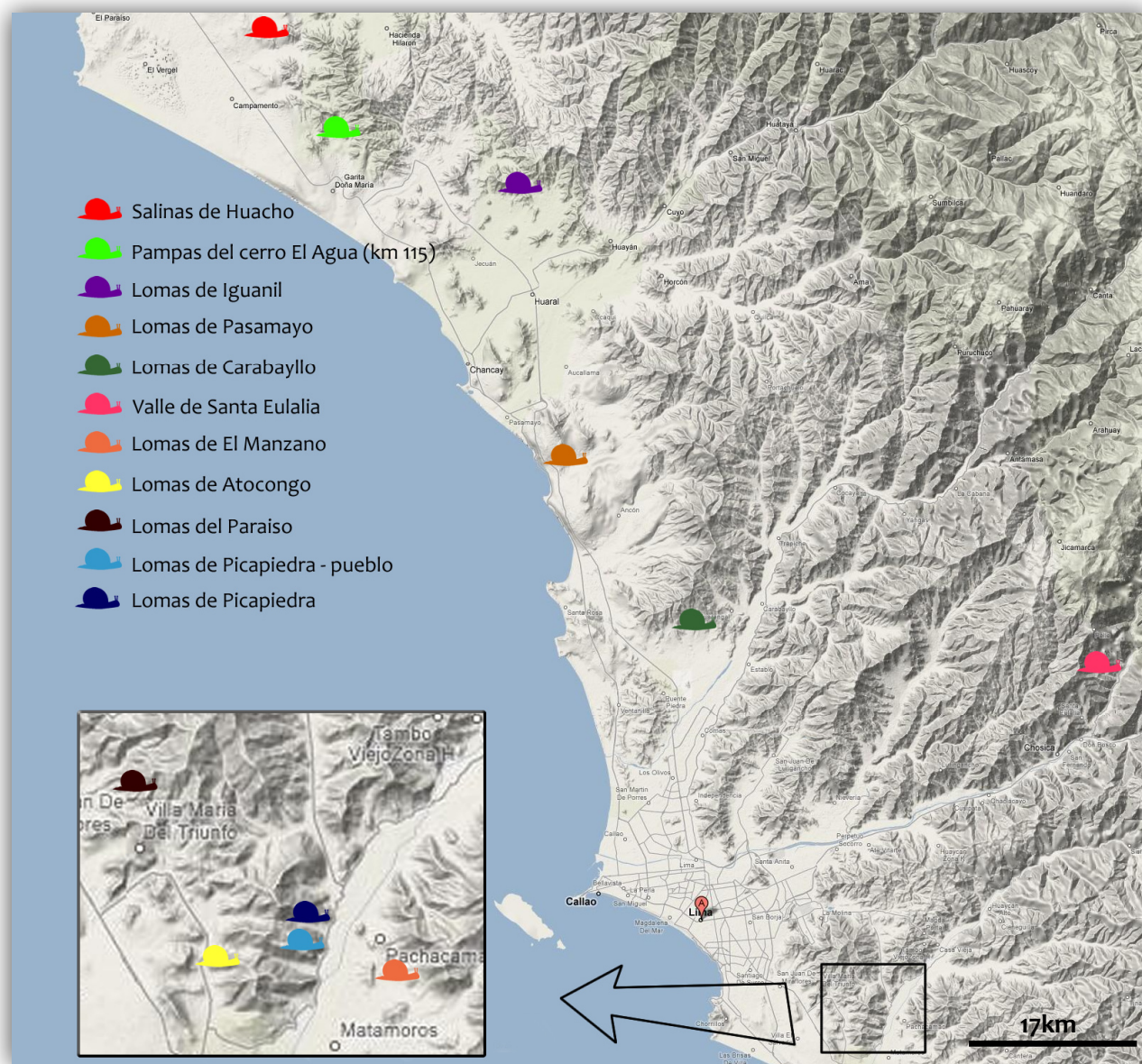


Figura 1. Localidades visitadas durante el desarrollo de la presente tesis. Están situadas dentro del departamento de Lima y de la provincia de Lima. Fuente: Google Maps.

MATERIAL BIOLÓGICO

A. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las especies involucradas en el presente estudio (*B. modestus*, *B. sordidus*, *B. scalariformis* y *B. conspersus*) se encuentran distribuidas principalmente en las Lomas del departamento de Lima. Sin embargo, *B. turritus* y dos de los representantes del complejo *B. modestus* (*B. modestus* y *B. sordidus*), extienden sus límites a las Lomas del departamento de Ancash e inclusive a valles interandinos, mientras *B. conspersus* hasta el departamento de Arequipa. Ello contrasta con la distribución de *B. scalariformis* que ha sido reportado exclusivamente en Lomas arenosas al norte de la ciudad de Lima (Ramírez, 2004). Los muestreos se realizaron entre Noviembre de 2006 y Junio de 2008. En la **Tabla 1** se encuentran las coordenadas, altitudes y distancia al mar de las localidades en las que se pudieron encontrar ejemplares vivos.

Hacia el kilómetro 65 de la carretera Panamericana Norte se encuentran las Lomas de Pasamayo (11° 38' 36,2"S, 77° 12' 11,9"O) (**Figura 2**). Estas Lomas de terreno arenoso (**Figura 3**), en invierno se cubren con densa neblina y vegetación herbácea, es un lugar donde abundan ejemplares de la especie *B. scalariformis*. Las muestras de esta Loma se colectaron en Setiembre de 2006.

Huacho es la localidad tipo señalada para *B. modestus*, sin embargo sólo ha sido encontrada en Las salinas de Huacho (Ramírez, 2004). Ésta se sitúa a dos horas de Lima, en el km 131 de la carretera Panamericana Norte. De Lima a Huacho, hacia la izquierda, existe una pista asfaltada que se dirige a las Salinas de Huacho (11°13'39.98"S/77°29'23.93"O). El terreno es propiedad de la empresa Quimpac S.A. desde el km 118 hasta el km 138, por lo que se consultó al personal de vigilancia si se podía tener acceso a sus instalaciones identificándonos como estudiantes de la UNMSM. Sin embargo, después de algunas consultas telefónicas, el acceso nos fue negado. Aparentemente el Km 130 ya no se encontraba a cargo del personal de vigilancia, por lo que a este nivel se ingresó al punto de referencia indicado. Éste correspondía a una formación de *Tillandsia* sp., al que se pudo acceder luego de aproximadamente 6 horas de búsqueda, sin embargo, sólo se llegó a encontrar grandes cantidades de conchas, y ejemplares secos aun adheridos a plantas suculentas de un metro de alto. Desde este lugar se observaba densa humareda, probablemente de un basural o algún tipo de empresa artesanal. Esta salida se realizó en

Abril de 2007, época bastante seca, y de ahorro de energía para los animales, lo que pudo influir en nuestros resultados negativos.

Tabla 1. Relación del lugar de procedencia de las muestras biológicas empleadas en el presente estudio, indicándose latitud (L-S), longitud (LW), altitud en metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), distancia al mar en kilómetros y las especies encontradas en cada caso.

Localidad	LS	LW	Altitud (m.s.n.m.)	Distancia al mar (km)	Especies encontradas
Lomas de Iguanil	11°21'46.95"	77°25'47.07"	581	14.7	<i>Bostryx sordidus</i>
Pampa Santa María (Km 115)	11°22'14.5"	77°26'24.5"	325	4.9	<i>Bostryx scalariformis</i>
Lomas de Pasamayo	11°38'36.2"	77°12'11.9"	420	0.9	<i>Bostryx scalariformis</i>
Lomas del Paraíso	12°08'14.23"	76°55'12.20"	757	50.0	<i>Bostryx modestus</i>
Lomas de Atocongo	12°12'05.68"	76°53'38.88"	478	7.0	<i>Bostryx modestus</i> - <i>Bostryx conspersus</i>
Lomas de Picapiedra	12°10'51.52"	76°52'25.03"	397	10.4	<i>Bostryx modestus</i>
Lomas de Picapiedra - pueblo	12°11'38.94"	76°52'14.07"	234	9.3	<i>Bostryx modestus</i>
Lomas de el Manzano	12°12'3.36"	76°49'48.05"	306	11.5	<i>Bostryx modestus</i> - <i>Scutalus</i> sp.
Valle de Santa Eulalia	11°52'22.90"	76°39'16.16"	1323	51.8	<i>Bostryx sordidus</i> - <i>Bostryx turritus</i>
Lomas de Mongón	9°36'43.31"	78°17'22.22"	538	6.7	<i>Scutalus versicolor</i>

La zona en la que se sitúan las Lomas de Iguanil ($11^{\circ}23'53.33''S/77^{\circ}14'01.2''O$) (**Figura 4**), es llamada por los moradores locales Lomas de Granados. Los alrededores de las Lomas han sido cercados con una acequia y protegida por una entrada de rejas que impide la entrada de vehículos, pero accesible a personas a pie, esto ha ayudado a que no se construyan viviendas dentro. Las Lomas de Iguanil podrían separarse en dos sectores, uno que está en las faldas de la loma, absolutamente llano de fácil acceso y otro que correspondería a las partes altas. En el llano la colecta fue muy provechosa, se habían sembrado plantas arbustivas en las que se encontró numerosos ejemplares de *B. conspersus*. El ascenso es bastante empinado, subiendo la loma estaba cubierta de vegetación herbácea, además pululaban moscas domesticas que llegaban a entorpecer el ascenso a causa de su abundancia. Al parecer, en las cercanías existen amplios depósitos de basura. Esta colecta se realizó en Abril de 2007, época considerada como de baja actividad para los caracoles, sin embargo, se pudo colectar sin problemas ejemplares de *B. sordidus* y ya por encima de los 600 m.s.n.m., *B. aguilari*, durante la caminata en las zonas próximas a rocas grandes y arbustos. Se llegó hasta los 735 m.s.n.m. (**Figura 5**).

La pampa a la altura del cerro El Agua se ubica alrededor del km 115 ($11^{\circ}22'14.5''S/77^{\circ}26'24.5''O$) de la carretera Panamericana Norte, la que la fracciona en dos partes. Ha sido en tiempos recientes un punto seguro de colecta para *B. scalariformis*, está bastante alejado de asentamientos humanos y posee poca actividad humana a la vista (**Figura 6**). En la zona se observan conchillas desde el borde mismo de la carretera (**Figura 7**); a pesar de que en épocas de baja actividad en las Lomas la vida es prácticamente inapreciable, bajo algunas rocas o incluso cubiertos por envases plásticos se consigue *B. scalariformis*. Al alejarse de la carretera por lo menos 500 m al oeste son apreciables algunos atisbos de vegetación, resistente al tiempo de verano, es aquí donde se encuentran más de estos ejemplares en estivación. La colecta en esta localidad se realizó también en el mes de Abril de 2007.



Figura 2. Vista aérea de las Lomas de Pasamayo, muy cercana a la Panamericana Norte, altura del km 65. Departamento de Lima, Provincia de Huaral, Distrito de Aucallama. Fuente: Google Earth 4.3.7284.3916 (beta).



Figura 3. Lomas de Pasamayo. Departamento de Lima, Provincia de Huaral, Distrito de Aucallama. Fuente: Pedro Romero. Junio de 2007

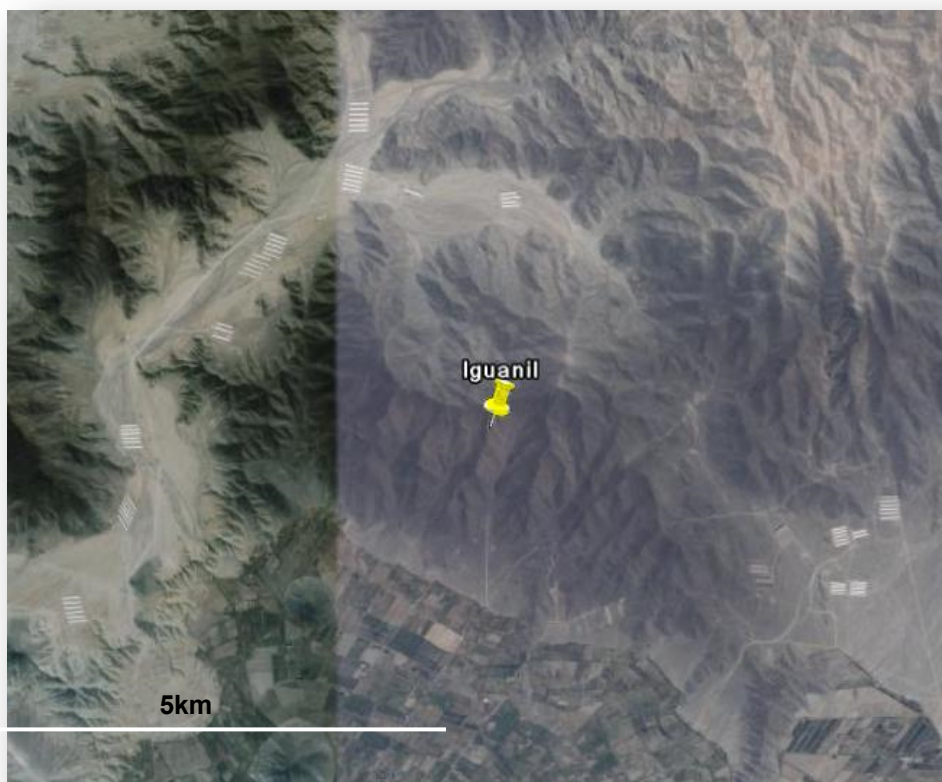


Figura 4. Vista aérea de las Lomas de Iguanil ($11^{\circ}23'53.33''S/77^{\circ}14'01.2''O$), a las faldas de las Lomas se observa gran cantidad de áreas de cultivo. Departamento de Lima, Provincia de Huaral, Distrito de Huaral, capital de la provincia. Fuente: Google Earth 4.3.7284.3916 (beta).



Figura 5. Meseta cercana a la cima de las Lomas de Iguanil ($11^{\circ}23'53.33''S/77^{\circ}14'01.2''O$), la visita se dio en la época seca cuando los cactus constituían la vegetación representativa. Departamento de Lima, Provincia de Huaral, Distrito de Huaral, capital de la provincia. Abril de 2008.

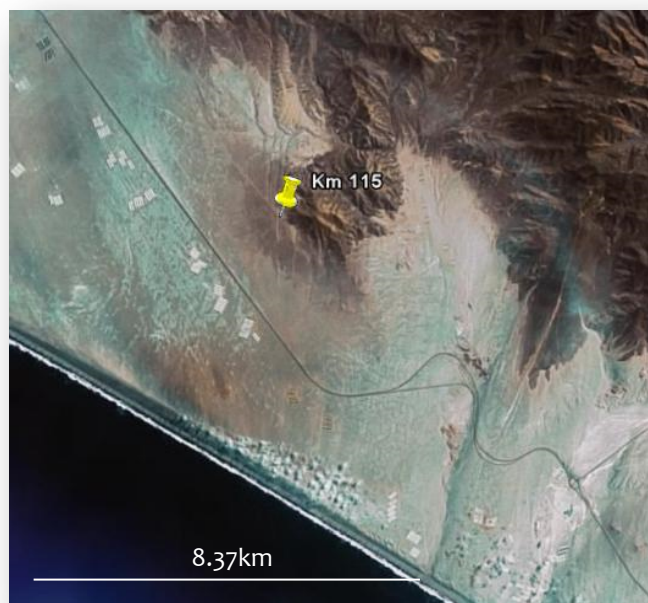


Figura 6. Vista aérea de las pampas del cerro El Agua (Km 115) ($11^{\circ} 22'14.5''$ S/ $77^{\circ}26'24.5''$ O), se observa claramente la cercanía a la Panamericana Norte km 115. Departamento de Lima, Provincia de Huaura, Distrito de Huacho. Fuente: Google Earth 4.3.7284.3916 (beta).



Figura 7. Pampas del cerro El Agua (Km 115) ($11^{\circ} 22'14.5''$ S/ $77^{\circ}26'24.5''$ O), desde muy cerca a la carretera se observa gran cantidad de conchillas. Departamento de Lima, Provincia de Huaura, Distrito de Huacho. Abril de 2007.

Las Lomas de Atocongo ($12^{\circ}12'5''S/76^{\circ}53'38''O$) son exuberantes para épocas de invierno, como la mayoría de Lomas. En las épocas de verano cambia totalmente, al desaparecer el alimento y encontrarse en condiciones adversas, el ahorro de energía se vuelve indispensable para los animales (**Figura 8**). Año a año se están reduciendo en extensión, debido al crecimiento de los asentamientos humanos (**Figura 9**). Aquí encontramos, además de una gran diversidad de fauna, dos de las especies estudiadas, *B. conspersus* y *B. modestus* siempre asociados a vegetación. Se realizaron colectas en dos oportunidades, en Agosto de 2006, época de gran abundancia, y en Mayo de 2008, el contraste fue notorio.

Las lomas de Paraíso ($12^{\circ}08'14''S/76^{\circ}55'12''O$), tiempo atrás se habían designado como zona de “turismo ecológico” (**Figura 10**). Lo que aun permanece en esta loma de ese fugaz intento por convertirlo en zona de ecoturismo, es un cerco que impide a los pobladores construir sus viviendas sobre las Lomas (**Figura 11**). La visita a esta loma se dio en Abril de 2008, a simple vista la vida era inexistente, salvo algunos arbustos secos en las faldas de la loma. Se avanzó cuesta arriba durante al menos 3 horas, inicialmente por donde se señalaba como camino de esta “zona turística” y después por la zona más accesible, hasta ese momento sólo se había encontrado fauna característica de Lomas y ejemplares de *B. conspersus* (**Figura 12**). Se continuó ascendiendo por 45 minutos más y finalmente donde no pareciera existir vida, adheridos a rocas se halló especímenes de *B. modestus*, bastante grandes y de ápice rosado, mucho más que en otros lugares de colecta.

El muestreo en las Lomas de Picapiedra ($12^{\circ}10'51.52''S/76^{\circ}52'25.03''O$) no pudo realizarse según lo planeado. La entrada a esta loma se encuentra cercada por una concesión de Cementos Lima al cual actualmente sólo es posible acceder realizando una petición formal. Ante la imposibilidad de acceder a las instalaciones de Cementos Lima y la imperiosa necesidad de conseguir ejemplares vivos para el estudio, se optó por buscar en lugares aledaños. Así, se decidió seguir la carretera en dirección contraria a Manchay Bajo y a 1.5 km aproximadamente se encontró un lugar asequible ($12^{\circ}11'38.94''S/76^{\circ}52'14.07''O$), del que se pudo obtener muestra biológica con relativa facilidad; en la **Figura 13**, se muestra su ubicación en referencia a las Lomas de Picapiedra. En tan sólo escasos 40 m² de superficie a unos 150 m.s.n.m. se colectaron cerca de 20 ejemplares de *B. modestus* (**Figura 14**) y cinco ejemplares de *B. conspersus*, en un lugar en el que prácticamente la vegetación era inexistente. Esta colecta se realizó a finales del mes de Mayo de 2008.



Figura 8. *B. conspersus* en estivación en las Lomas de Atocongo ($12^{\circ}12'5''S/76^{\circ}53'38''O$). Provincia de Lima, Distrito de Villa Maria del Triunfo. Junio 2008.



Figura 9. Faldas de las Lomas de Atocongo, en algunos casos los muros de protección del área constituyen las paredes posteriores de las viviendas ($12^{\circ}12'5''S/76^{\circ}53'38''O$). Provincia de Lima, Distrito de Villa Maria del Triunfo. Mayo de 2008.



Figura 10. Vista panorámica de las Lomas de Paraíso ($12^{\circ}08'14''\text{S}/76^{\circ}55'12''\text{O}$). Provincia de Lima, Distrito de Villa María del Triunfo. Noviembre de 2008.

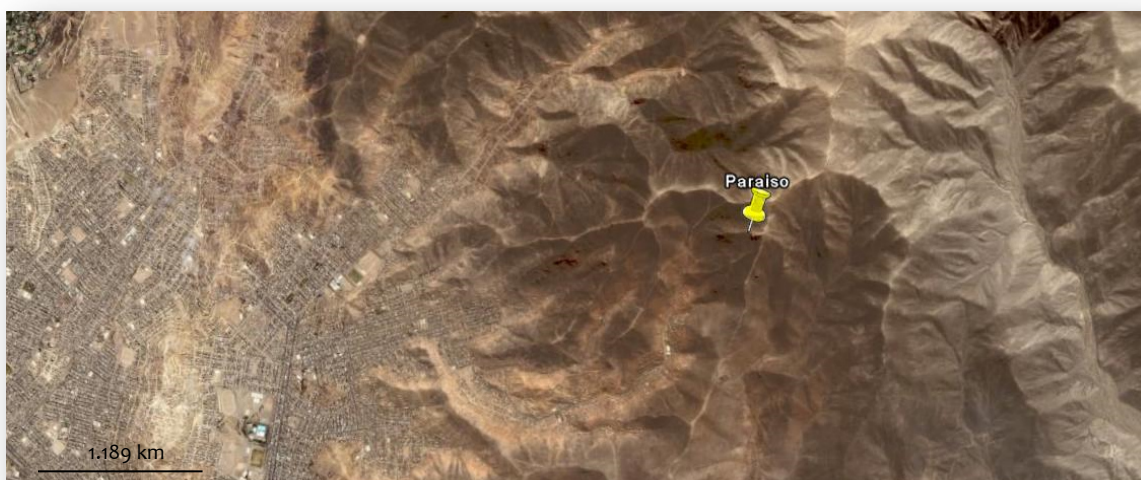


Figura 11. Vista Aérea de las Lomas de Paraíso ($12^{\circ}08'14''\text{S}/76^{\circ}55'12''\text{O}$), se aprecia el enorme crecimiento poblacional. Provincia de Lima, Distrito de Villa María del Triunfo. Fuente: Google Earth 4.3.7284.3916 (beta).



Figura 12. *B. conspersus* en estivación en las Lomas de Paraíso ($12^{\circ}08'14''\text{S}/76^{\circ}55'12''\text{O}$). Provincia de Lima, Distrito de Villa María del Triunfo. Noviembre de 2008.



Figura 13. Ambas zonas muestreadas próximas a margen derecha del Rio Lurín, Lomas de Picapiedra ($12^{\circ}10'51.52''S/76^{\circ}52'25.03''O$) y el otro punto de colecta llamado Picapiedra pueblo ($12^{\circ}11'38.94''S/76^{\circ}52'14.07''O$). Provincia de Lima, Distrito de Pachacamac. Fuente: Google Earth 4.3.7284.3916 (beta).



Figura 14. *B. modestus* de Picapiedra – pueblo ($12^{\circ}11'38.94''S/76^{\circ}52'14.07''O$). Provincia de Lima, Distrito de Pachacamac. Mayo de 2008.

Las Lomas de El Manzano (12° 11'42.19"S/ 76°50'04.62"O) (**Figura 15**) se sitúan a cuatro kilómetros de la plaza de armas de Pachacamac, aproximadamente 70 minutos a pie. Sin embargo, la mayoría de las personas que se desplazan por la zona usan movilidad particular, mototaxi, moto o bicicleta. Las Lomas de El Manzano se ubican adyacentes a un caserío con poca densidad poblacional. Sus ondulaciones sutiles en la zona de las pampas la hacen atractiva para deportes extremos, tipo motocross y ciclismo de montaña, lo que es muy recurrente. La colecta fue realizada en el mes de Junio de 2008. Al iniciarse la búsqueda fueron encontrados con relativa facilidad ejemplares de *B. modestus* aferrados a vegetación seca y entre guijarros (**Figura 16**), siendo poco frecuentes ejemplares de *Scutalus* sp. En la zona más elevada (600 m.s.n.m.) se encontraron especímenes de *B. conspersus* y algunos más de *B. modestus*. A 600 m.s.n.m la sensación de frío y humedad que acompañaban a la neblina, se hacían insoportables.

En las Lomas de Carabayllo (11°48'02.5" S/77°02'40.1"O) está reportada la presencia de la especie *B. sordidus*. La salida se dio en Noviembre de 2006, se reconocieron algunas zonas más húmedas que otras en este lugar. Desde los 486 m.s.n.m. se encontraron conchillas, 300 metros más arriba (710 m.s.n.m.) ya son evidentes los ejemplares vivos de al menos dos de las especies en estudio, *B. sordidus* y *B. conspersus*.

La búsqueda en el valle de Santa Eulalia (11°51'40.18"S/76°39'22.87"O) (**Figura 17**) se dio en el mes de Mayo de 2008. Para acceder al valle de Santa Eulalia se caminó un largo trecho, antes de que se encuentre un lugar de ascenso asequible. Finalmente se decidió subir por un camino que aparentaba ser un cause de agua seco; avanzando por él, se encontraron pintas bastante agresivas, era propiedad privada y perteneciente a un morador local poseedor de chacras en la parte superior del camino. Se decidió retroceder al punto inicial y explicarle muy amablemente al dueño cual era nuestro objetivo, éste accedió a darnos paso a sus terrenos. La zona de muestreo, pendiente derecha del camino antes mencionado, se designó por su relativo fácil acceso. Al ir ascendiendo se hicieron evidentes cactus de diferentes tipos, achaparrados, largos, vivos y secos (**Figura 18**). Los primeros caracoles en ser encontrados fueron ejemplares de *Scutalus* sp., y durante el ascenso ejemplares de *B. sordidus* asociados a vegetación y a rocas. Entre y dentro de cactáceas secas se hallaron al menos 10 ejemplares de *B. turritus*. Toda la búsqueda se realizó en aproximadamente cuatro horas.



Figura 15. Vista panorámica desde las Lomas de El Manzano ($12^{\circ} 11'42.19''S / 76^{\circ}50'04.62''O$). Provincia de Lima, Distrito de Pachacamac. Junio de 2008.



Figura 16. *B. modestus* de El Manzano ($12^{\circ} 11'42.19''S / 76^{\circ}50'04.62''O$). Provincia de Lima, Distrito de Pachacamac. Junio de 2008.

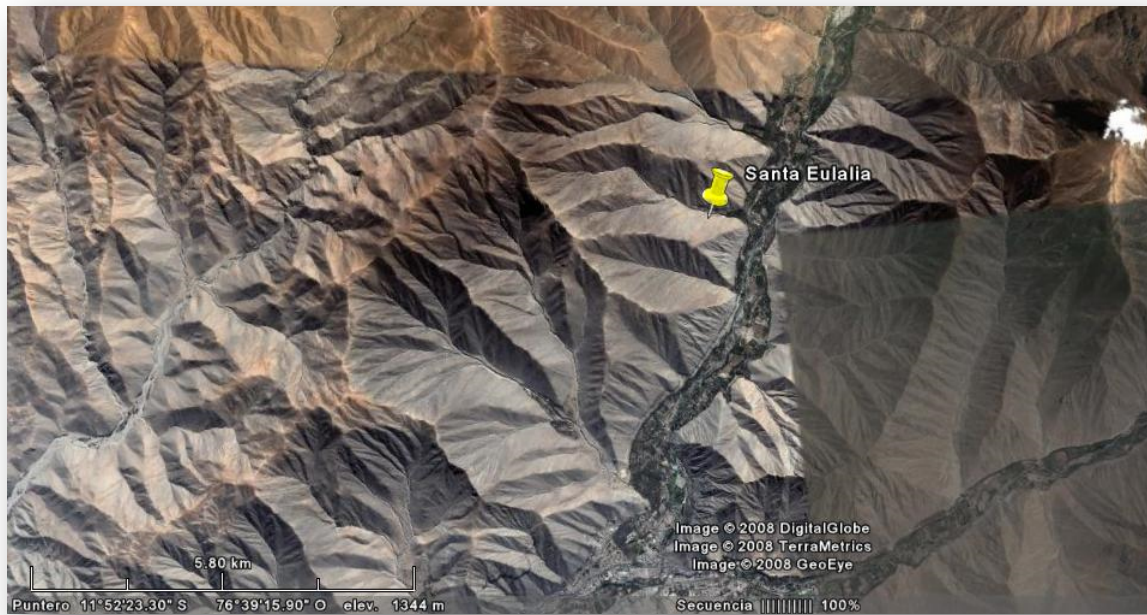


Figura 17. Vista aérea del Valle de Santa Eulalia ($11^{\circ}51'40.18''\text{S}/76^{\circ}39'22.87''\text{O}$). Departamento de Lima, Provincia de Huarochirí, Distrito de San Eulalia. Fuente: Google Earth 4.3.7284.3916 (beta).



Figura 18. Zona de Colecta en el Valle de Santa Eulalia ($11^{\circ}51'40.18''\text{S}/76^{\circ}39'22.87''\text{O}$) se observa abundante presencia de cactus. Departamento de Lima, Provincia de Huarochirí, Distrito de San Eulalia. Mayo de 2008.

B. INDIVIDUOS

Los individuos corresponden a las especies del complejo *B. modestus*, conformado por *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*. Aunque la propuesta original sólo contemplaba a *B. conspersus* como grupo externo, se vió por conveniente incluir además a otras especies de la familia Orthalicidae (*B. turritus*, *Scutalus versicolor*, *Scutalus* sp.)

Se muestran a continuación los 29 individuos que formaron parte del presente estudio, nueve de los cuales fueron obtenidos por el equipo de trabajo del laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía. De los 20 ejemplares restantes, 18 corresponden a muestras colectadas recientemente y dos son vouchers indexados por Ramírez (2004). Se les midió altura (H>), diámetro mayor (D>), altura de la abertura (h), ancho de la abertura (d) y se contó el número de vueltas (#vueltas). La altura y el diámetro mayor se plotearon en una gráfica, a fin de visualizar el tamaño de los ejemplares utilizados.

Todo el material biológico que se presenta a continuación se empleó para el presente estudio y actualmente forma parte de la colección científica del Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.



Figura 19

Especie: *B. modestus*

Individuo: c74f_1

Localidad:

Lomas de Atocongo

Colectores:

Carlos Congrains, Jorge

Ramírez, Ana Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008



Figura 20

Especie: *B. modestus*

Individuo: c11g_5

Localidad:

Lomas de El Manzano

Colectores:

Daniel Fernández, Jorge

Ramírez, Ana Chumbe.

Fecha: Junio de 2008



Figura 21

Especie: *B. modestus*

Individuo: c75f_2

Localidad:

Lomas de El Manzano

Colectores: Daniel

Fernández, Jorge Ramírez,

Ana Chumbe.

Fecha: Junio de 2008



Figura 22

Especie: *B. modestus*

Individuo: c9g_3

Localidad:

Lomas de El Manzano

Colectores:

Daniel Fernández, Jorge

Ramírez, Ana Chumbe.

Fecha: Junio de 2008.



Figura 23

Especie: *B. modestus*

Individuo: c6f_1

Localidad:

Lomas de Paraíso

Colectores:

Pavel Matos, Daniel Giraldo,

Jorge Ramírez, Ana Chumbe.

Fecha: Abril de 2007.



Figura 24

Especie: *B. modestus*

Individuo: c7f_2

Localidad:

Lomas de Paraíso

Colecores:

Pavel Matos, Daniel

Giraldo, Jorge Ramirez,

Ana Chumbe.

Fecha: Abril de 2008.



Figura 25

Especie: *B. modestus*

Individuo: 30f_2

Localidad:

Picapiedra –pueblo

Coletores:

Victor Borda, Pável Matos,,

Jorge Ramirez, Ana Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008.



Figura 26

Especie: *B. modestus*

Individuo: c31f_3

Localidad:

Picapiedra –pueblo

Coletores:

Victor Borda, Pável Matos, Jorge

Ramirez, Ana Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008.



Figura 27

Especie: *B. modestus*

Individuo: c79e_59

Localidad:

Lomas de Picapiedra

Coletores:

Ramírez et al.

Fecha: Enero de 2001.



Figura 28

Especie: *B. modestus*

Individuo: c80e_78

Localidad:

Lomas de Picapiedra

Colectores:

Ramírez et al.

Fecha: Enero de 2001.

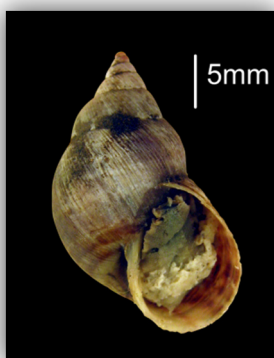


Figura 29

Especie: *B. sordidus*

Individuo: c14a_15

Localidad:

Lomas de Iguanil

Colectores:

Norma Martínez, Pedro

Romero, Jorge Ramirez, Ana

Chumbe.

Fecha: Abril de 2007.



Figura: 30

Especie: *B. sordidus*

Individuo: c73e_1

Localidad:

Valle de Santa Eulalia

Colectores:

Daniel Fernández, Carlos

Congrains, Jorge Ramirez,

Pavel Matos, Ana Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008.



Figura 31

Especie: *B. sordidus*

Individuo: c74e_2

Localidad:

Valle de Santa Eulalia

Colectores:

Daniel Fernandez, Carlos

Congrains, Jorge Ramirez,

Pavel Matos, Ana Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008.



Figura 32

Especie: *B. sordidus*

Individuo: c75e_3

Localidad:

Valle de Santa Eulalia

Colectores:

Daniel Fernandez, Carlos

Congrains, Jorge Ramirez, Pavel

Matos, Ana Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008.



Figura 33

Especie: *B. sordidus*

Individuo: c76e_4

Localidad:

Valle de Santa Eulalia

Colectores:

Daniel Fernandez, Carlos

Congrains, Jorge Ramirez, Pavel

Matos, Ana Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008.

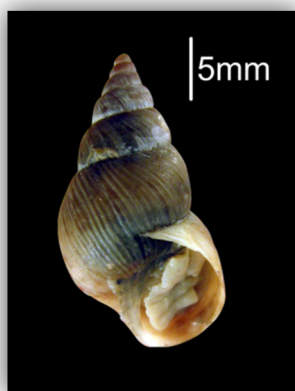


Figura 34

Especie: *B. sordidus*

Individuo: c77e_5

Localidad:

Valle de Santa Eulalia

Colectores:

Daniel Fernandez, Carlos

Congrains, Jorge Ramirez, Pavel

Matos, Ana Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008.



Figura 35

Especie: *B. scalariformis*

Individuo: c3a_3a

Localidad:

Cerro El Agua (Km 115)

Colectores:

Norma Martínez, Pedro

Romero, Jorge Ramirez, Ana

Chumbe.

Fecha: Abril de 2007.



Figura 36

Especie: *B. scalariformis*

Individuo: c84_b

Localidad:

Cerro El Agua (Km 115)

Colectores:

Norma Martínez, Pedro Romero,

Jorge Ramirez, Ana Chumbe

Fecha: Abril de 2007.

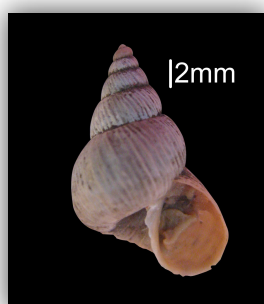


Figura 37

Especie: *B. scalariformis*

Individuo: c75_3

Localidad:

Lomas de Pasamayo

Colectores:

Pedro Romero

Fecha: Setiembre de 2006



Figura 38

Especie: *B. scalariformis*

Individuo: c81_9

Localidad:

Lomas de Pasamayo

Colectores:

Pedro Romero.

Fecha: Setiembre de 2006



Figura 39

Especie: *B. scalariformis*

Individuo: c79_7

Localidad:

Lomas de Pasamayo

Colectores:

Pedro Romero.

Fecha: Setiembre de 2006



Figura 40

Especie: *B. conspersus*

Individuo: c23f_12

Localidad:

Lomas de Atocongo

Colectores:

Carlos Congrains, Jorge Ramirez,

Ana Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008.



Figura 41

Especie: *B. turritus*

Individuo: c1f_1

Localidad:

Valle de Santa Eulalia

Colectores:

Daniel Fernández, Carlos Congrains,

Jorge Ramirez, Pavel Matos, Ana

Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008.



Figura 42

Especie: *B. turritus*

Individuo: c4f_4

Localidad:

Valle de Santa Eulalia

Colectores:

Daniel Fernandez, Carlos Congrains,

Jorge Ramirez, Pavel Matos, Ana

Chumbe.

Fecha: Mayo de 2008.



Figura 43

Especie: *S. versicolor*

Individuo: c11_8

Localidad:

Lomas de Mongón

Colectores:

Rina Ramírez, Telmo Ramos

Fecha: Agosto de 2005



Figura 44

Especie: *S. versicolor*

Individuo: c12_4

Localidad:

Lomas de Mongón

Colectores:

Rina Ramírez, Telmo Ramos.

Fecha: Agosto de 2005



Figura 45

Especie: *S. versicolor*

Individuo: c41_54

Localidad:

Lomas de Mongón

Colectores:

Rina Ramírez, Telmo Ramos.

Fecha: Agosto de 2005



Figura 46

Especie: *S. versicolor*

Individuo: c42_7

Localidad:

Lomas de Mongón

Colectores:

Rina Ramírez, Telmo Ramos.

Fecha: Agosto de 2005



Figura 47

Individuo: c83f_2

Especie: *Scutalus* sp.

Localidad:

Lomas de El Manzano

Colectores:

Daniel Fernández, Jorge Ramirez, Ana Chumbe.

Fecha: Junio de 2008.

C. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL

Todo material biológico colectado en campo fue seleccionado y posteriormente ahogado. Inicialmente se reemplazaba de una sola vez, todo el agua por etanol 96°, con lo que el animal muchas veces se guardaba por completo dentro de su concha y consecuentemente dificultaba la obtención de la muestra de tejido muscular, que es el material con el que se trabaja. Después se optó por reemplazar paulatinamente la cantidad de agua por etanol 96° y en 8 horas aproximadamente ya se tenía al animal en etanol 96°C.

El tiempo de permanencia de la muestra biológica en etanol previo al siguiente paso, que corresponde al corte y posterior fraccionamiento del pie del animal, fue variable, de 1 a 35 días en algunos casos. Mas siempre se procuraba que sea el menor tiempo posible, por los problemas encontrados con las muestras de colecciones científicas.

Las muestras que se tenían inicialmente proyectadas para el presente estudio constituían material de referencia (*vouchers*) de la tesis Sistemática e Filogeografía dos Moluscos do Ecosistema de “Lomas” do Deserto da Costa Central do Perú (Ramírez, 2004). Se trabajó inicialmente con un 1 mm³, proveniente de cortes de 2mm³ de los mencionados *vouchers* obtenidos de la Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Porto Alegre – Brasil). Luego se trabajó con cortes de mayor tamaño, obtenidos de los mismos animales cuando se dispuso de ellos. En una buena parte de las muestras se empleó TE 1X, en los que se mantuvo a las muestras cortadas listas para extracción por al menos dos horas previas a su procesamiento.

EXTRACCIÓN DE DNA

El acondicionamiento y procesamiento de las muestras para extracción se llevó a cabo en el laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (SMF-UNMSM).

Las muestras obtenidas tanto del campo como de colecciones malacológicas científicas, se sometieron a extracción de DNA total. Entre Mayo de 2007 y Junio de 2008 se realizaron 201 extracciones de DNA total de 149 individuos. Se usó la técnica del CTAB (Doyle & Doyle, 1987), modificada por Ramírez (2004). El CTAB es una sal de amonio cuaternario con propiedades detergentes que solubilizan la membrana, además de ocuparse de los mucopolisacáridos, que inhiben los procesos de síntesis de DNA (Graham et al., 1994). A las

muestras se les separó 1 mm³ de tejido muscular de pie cuando no se disponía del animal completo, y 2 mm³ aprox. en caso contrario. Se le incorporaba a una solución de 300 µl, que incluía 100 mM de Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2 % CTAB, 2 % PVP, 0.2 % de β-Mercaptoetanol y proteinasa K (la cantidad de proteinasa utilizada fue variable según la procedencia de la muestra, siguiendo la tendencia de incrementarse conforme más antigua era la muestra). Esto se mantenía digiriendo en baño maría a 60°C durante 2 o más horas, dependiendo del estado de la muestra.

En cuanto a la remoción de proteínas, se empleó 310 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (96:4), seguido de una centrifugación a 13000 rpm por 15 min, rescatando la fase acuosa del componente apolar donde se encuentran atrapados los desechos. De la fase acuosa, aunque variable según la digestión, se tenía por defecto rescatar 240 µL para esta primera separación. Dicho procedimiento se repetía una vez más para luego precipitar el DNA con 600 µL de etanol 96 % frío y 25 µL de acetato de amonio 3 M y ser mantenido a -20 °C por al menos 30 min. Seguidamente se centrifugaba a 13000 rpm por 15 min, luego se descartaba el sobrenadante y el *pellet* se lavaba en 1 ml de etanol 96%, se centrifugaba una vez más a la misma velocidad y se descartaba el sobrenadante.

Finalmente el *pellet* de DNA se secó en estufa a 37 °C por una hora o al ambiente por 24 horas, tiempo luego del cual se resuspendía en agua bidestilada. El volumen en el que se resuspendían los *pellets* de DNA total iban desde 20 µL hasta 50 µL en baño maría 37 °C de temperatura por un periodo mínimo de 8 horas. El DNA en solución es mantenido a -20°C. En la **Tabla 2** se muestran los individuos y las extracciones de DNA total por especie.

Tabla 2. Individuos y extracciones por especie trabajada.

Especie	Individuos	Extracciones
<i>B. modestus</i>	55	82
<i>B. limmensis</i> (= <i>B. sordidus</i>)	16	29
<i>B. laurenti</i>	5	5
<i>B. sordidus</i>	32	39
<i>Scutalus</i> sp.	2	2
<i>B. turritus</i>	5	5
<i>B. conspersus</i>	34	39
Total	149	201

AMPLIFICACIÓN DE DNA

El gen COI nunca antes se había amplificado en las especies en estudio, ni en otros miembros de la familia Orthalicidae, por lo cual se emplearon los primers universales diseñados por Folmer et al. (1994). El uso de los primers LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') diseñados en base a 11 phyla de invertebrados terrestres (Folmer et al., 1994) no había sido estandarizado en nuestro laboratorio. Como indicativo previo de un potencial éxito en la amplificación de COI se vio por conveniente realizar una reacción de PCR previa para 16S rRNA (Ramírez, 2004), el que es utilizado rutinariamente en nuestro laboratorio, de esta manera se descartaría la incertidumbre de la calidad del DNA para amplificaciones.

La región “Folmer” amplificada por estos primers, corresponde a la región 5' del gen que codifica el citocromo C Oxidasa subunidad I (COI) de aproximadamente 710 pb.

Para la amplificación del COI, en una volumen de reacción de 30 µL, los componentes son: 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP y 400 nM del primer a utilizar y 3 µL de DNA extraído.

Se siguió un protocolo de 35 ciclos iniciando con una denaturación a 94°C por 30 seg., hibridación de los primers a 48 °C o menos por 30 seg., (variando entre 44-45°C para las muestras del complejo *B. modestus*) y extensión a 72°C durante 60 seg. Para el control se sustituía el DNA por agua bidestilada. Si es que surgían bandas inespecíficas se incrementaba la temperatura de *annealing* (Ta) paulatinamente pudiendo llegar hasta 50 – 55 °C, y si es que no resultaba banda alguna se disminuía el Ta, llegando hasta los 40 °C.

Se tiene como proceso cotidiano en nuestro laboratorio realizar amplificaciones de prueba de 12.5 µL de volumen. Según los resultados obtenidos en estas amplificaciones se diseñaba un plan de trabajo. Si todo se daba según lo planeado las muestras de estas amplificaciones positivas realizadas a 12.5 µL, se amplificaban en 30 µl y quedaban listas para ser enviadas a secuenciamiento.

Sin embargo, por esos misterios que abundan en la investigación, se daban casos en los que algunas muestras no daban resultados positivos en 30 µL a pesar de sí haberlo hecho en 12.5 µL, en estos casos se procedía a realizar dos amplificaciones más, de 12.5 µL, y así se completaba el volumen mínimo requerido para secuenciamiento. Caso distinto acontecía

cuando en la etapa de prueba se agotaba la solución de DNA total. En estos casos se precisó realizar reamplificaciones de las muestras positivas de 12.5 µL.

Todas las amplificaciones se conservaron en hojas tecnopor rotuladas con fecha, marcador y volumen de reacción para facilitar su posterior ubicación, además envueltas con *film* evitando así la pérdida de alguna muestra hasta que llegue el momento de enviarlas al secuenciamiento.

VISUALIZACIÓN DE DNA

Para la visualización se la banda de DNA esperada se usó la técnica de de electroforesis horizontal en geles de agarosa de grado molecular al 1% ó 0.8%. Se mezcló 4 µL de la muestra amplificada con 1 µL de azul de bromofenol y fueron corridas frecuentemente a un voltaje de 100, durante 1h. La tinción se dio con bromuro de Etidio durante 10 min o más, según se requiriera. Luego de retirar el exceso de bromuro con agua corriente se procedió a la visualización con ayuda del transluminador del laboratorio de Microbiología Molecular. En el caso de haber resultado positivo, aparecerá al menos una banda de 700 pb. Para dar fe de la presencia de las bandas producto de las amplificaciones exitosas se fotografiaron los geles respectivos.

Se corría simultáneamente en los geles, además de las muestras en estudio, el control y el marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas).

SECUENCIAMIENTO

Las muestras que presentaron una única banda de tamaño esperado, con intensidad suficiente, fueron seleccionadas para secuenciamiento.

Las muestras seleccionadas se trasvasaron a microtubos de 1.5 mL, se rotularon con plumón indeleble en la cara lateral, con especificaciones tales como, individuo, marcador, volumen de muestra, y las reacciones a las que sería sometida (*forward* y *reverse*). Luego de esto se cubría todo el microtubo con *parafilm* para evitar pérdida de la muestra y proteger las rotulaciones. A su vez, seis de estos microtubos se introducían a tubos tipo falcon de fondo cónico de 50 mL de volumen. Todo el procedimiento debe ser realizado sobre hielo y teniendo en cuenta usar guantes limpios, además de verificar la lista reiteradas veces para tener certeza de que no se cometerá ningún error. La purificación y el secuenciamiento estuvieron a cargo de la compañía MACROGEN USA

(www.macrogenusa.com/company/aboutus.jsp). Esta empresa utiliza el método de terminación de la cadena desarrollado por Sanger (Sanger et al., 1977) con terminador fluorescente BigDye™ terminator y usa un secuenciador de DNA de 96 capilares modelo 3730xl de Applied Biosystems.

Las reacciones de PCR enviadas a MACROGEN correspondían a las especies del complejo *B. modestus* (*B. sordidus*, *B. modestus*, *B. scalariformis*) procedentes de las Lomas y valles interandinos de la costa central y norte del Perú. Asimismo, las especies que se emplearían como grupo externo: *B. conspersus*, *B. turritus*, *Scutalus* sp. En todos los casos se amplificaron ambas hebras (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias *contig* por especie utilizadas para la reconstrucción de la filogenia del complejo de especies *B. modestus* con el marcador Citocromo C oxidasa subunidad I (COI).

Especie	Nº de secuencias
<i>B. sordidus</i>	6
<i>B. modestus</i>	10
<i>B. scalariformis</i> *	5
<i>B. conspersus</i>	1
<i>B. turritus</i>	2
<i>Scutalus versicolor</i> *	4
<i>Scutalus</i> sp.	1

*Además se hizo uso de secuencias obtenidas en otro estudio por el equipo de trabajo del laboratorio del Sistemática Molecular y Filogeografía.

EDICIÓN DE SECUENCIAS

Las secuencias son recibidas en 3 formatos por reacción, un archivo de block de notas en donde figuran las especificaciones para la reacción, además de la secuencia misma en formato fasta, un archivo *.pfd con el resultado del cromatograma y otro con extensión *.ab1 legible por el programa Chromas1.3 (McCarthy, 1996), en este último formato se trabaja la edición manual de la secuencias, de ser necesario.

Para formar la secuencia consenso se trabajó con el CAP3 *Sequence Assembly Program* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) (Huang & Madan, 1999), al que se le provee de las secuencias *forward* y *reverse* (en reverso complementario). Posteriormente cada secuencia consenso era verificada en el GenBank, mediante la herramienta bioinformática Blastn.

ALINEAMIENTO

Con las secuencias consenso en formato fasta se realizó el alineamiento múltiple empleando el programa ClustalX 2.0 (Thompson *et al.*, 1997; Larkin *et al.*, 2007). Las opciones se dejaron por defecto.

Una vez confirmado el alineamiento se procedía a salvar las 706pb del alineamiento con dos archivos de salida adicionales, fasta y nexus.

Tener en consideración que para que el formato nexus que nos provee el ClustalX sea aceptado por el PAUP*4.0 (Swofford, 1998) y el MrBayesv3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), es necesario cambiar la extensión *.nxs por *.nex.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS

En el programa DNAsp 4.50 (Rozas *et al.*, 2003) se reconocieron los haplotipos presentes en las 29 secuencias en estudio. Seguidamente, en el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007; Kumar *et al.* 2008) se identificaron las posiciones variables y las informativas dentro de estas.

Para obtener el contenido de bases nitrogenadas por especie, y la diversidad haplotípica, se trabajó en el programa ARLEQUIN3.1. (Excoffier *et al.*, 2005). Este programa trabaja con formato arp (*.arp), el que se obtuvo transformando un archivo *.meg en el ARLEQUIN3.1.

Para evidenciar si existía saturación mutacional se empleó el programa DAMBE 5.0.23 (Xia, X. & Xie, 2001), se plotearon las transiciones y transversiones *versus* la distancia genética ajustada con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura dos parámetros (K-2p) considerando cada posición de codón por separado y todas las posiciones. En este programa también se calculó el parámetro α de la distribución *Gamma*.

ANÁLISIS DE DISTANCIAS GENÉTICAS

Se calculó las distancias genéticas estimando el número de diferencias y también las distancias corregidas mediante el modelo de sustitución nucleotídica Kimura dos parámetros (K-2p) con 0.33575 como parámetro α . Se midieron las distancias entre haplotipos y se graficaron utilizando el método UPGMA. Posteriormente se calcularon las distancias asociando los haplotipos menos distantes. Adicionalmente también se calcularon las distancias promedio dentro de cada grupo. Para los cálculos de distancias entre grupos

se eligió la opción *Compute Net Between Group Means* del menú *Distance* en el Programa MEGA4.0. Se hicieron gráficas para las distancias más representativas.

ESTIMACIÓN DE LA FILOGENIA

El análisis filogenético se realizó mediante el método algorítmico *Neighbor-joining* (NJ) con MEGA4.0, y los de optimización de caracteres Máxima Parsimonia (MP) y Máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*, ML) con PAUP*4.0b010, e Inferencia Bayesina (IB) con Mr.Bayes 3.1.2.

Se inicia el análisis con el alineamiento en formato nexus (*.nex). Además, con blocks de comandos elegidos según el análisis a realizar, los que también deben estar en formato nexus con extensión *.nex. Estos se introducen secuencialmente en el programa PAUP* que confirma a su vez, primero, que el programa haya reconocido toda la información y después que los comandos introducidos estén correctamente definidos y estén aptos para ser leídos por el programa.

Se procede a estimar el modelo de sustitución nucleotídica más adecuado para las secuencias involucradas en el estudio mediante el programa Modeltest3.7 (Posada & Crandall, 1998). Este programa testa entre 56 modelos y está implementado con dos diferentes criterios de selección, el Jerarquizado (hLRTs) y el criterio de selección de Akaike.

El método de NJ forma parte de los métodos actuales de reconstrucción de filogenias basado en matrices de distancias. Este método no examina todas las topologías posibles, sin embargo, procura encontrar secuencialmente vecinos que minimicen la longitud total del árbol. En el cálculo de la filogenia usando NJ, se escogió el modelo de sustitución nucleotídica K-2p en el programa MEGA4.0. con 0.33575 como parámetro α de la distribución *Gamma*. Además se especificó el análisis de *bootstrap* con 1000 remuestreos, para la evaluación estadística de la topología del árbol resultante.

A diferencia de los análisis basados en matrices de distancias, la MP, el ML y la IB analizan los estados de cada carácter. Particularmente, el análisis de MP está basado en la suposición de que el árbol más probable es el que requiere el menor número de mutaciones para explicar toda la variación observada en la matriz de caracteres (Holder & Lewis, 2003). Este método está basado en el principio de la homología, suponiendo que si dos taxones comparten una característica (una misma base nucleotídica), ésta proviene del último ancestro común compartido, deduciéndose que sólo considera sitios “informativos” para

ello (Nei & Kumar, 2000). El block de comandos de análisis de MP usado considera una búsqueda heurística, un algoritmo que busca atajos o suposiciones inteligentes para reducir la cantidad de tiempo, con incorporaciones aleatorias (*random aditions*) de 100 repeticiones (nReps=100) y *Tree-bisection-reconnection*, que es un algoritmo heurístico para la búsqueda de posibles árboles, quebrando los arboles en dos partes y reconectando estos dos subárboles en todas las ramas posibles, así, si un mejor árbol es encontrado, éste permanecería y otro *round* de TBR se iniciaría. El mismo tipo de búsqueda se eligió para el análisis de *bootstrap* (1000 repeticiones), que consisten en remuestreos para intentar estimar el nivel de confianza de las relaciones inferidas.

Dentro de los métodos de optimización de caracteres para estimación de filogenias, el ML soluciona con más precisión eventos mutacionales múltiples en una misma posición. Se plantea así un modelo de evolución de secuencia que describe la probabilidad relativa de dichos eventos sobre el que se juzgaría la hipótesis sobre cuan bien se pueden predecir los datos observados. Finalmente la hipótesis (árbol) que tenga las más altas probabilidades de producir las secuencias observadas sería la que mejor refleja la historia evolutiva. A diferencia del análisis de MP, el ML considera todos los sitios indistintamente.

El análisis de ML fue realizado con PAUP*4.0b10, el modelo elegido usando ModelTest 3.7 fue TVM+I+G, seis tipos de sustituciones, escogiendo un parámetro α de la distribución *gamma* de 1.3651 y proporción de sitios invariables (0.5870), con 1000 replicas de *bootstrap*. Esto arroja dos archivos también, un *.log, indicando en detalle el proceso que se observa en el *display* y el *.tre en donde se guarda el árbol producto del *bootstrap*.

Tanto el análisis de MP como el de ML generan dos archivos indicados previamente en el block de comandos, el archivo con extensión *.log, en donde vienen todas las especificaciones de las operaciones realizadas, y el archivo *.tre, que guarda los árboles obtenidos.

El uso del método de análisis bayesiano en la reconstrucción de filogenias es relativamente reciente (Rannala & Yang, 1996; Mau, 1996; Mau & Newton, 1997; Mau et al., 1999), representa actualmente una práctica alternativa frente a los demás métodos. Incorpora la información filogenética contenida en los datos, a partir del *likelihood*, que es una cantidad proporcional a la probabilidad de observar los datos dado un árbol. La principal diferencia con respecto al ML es el uso de las probabilidades posteriores de los arboles filogenéticos, además de utilizar una elegante y computacionalmente efectiva

manera de aproximación a las probabilidades posteriores de los árboles mediante el uso de las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) (Metropolis *et al.*, 1953; Hastings, 1970; Green, 1995). En general, posee ventajas en términos de habilidad para utilizar complejos modelos de evolución, fácil interpretación de los resultados y eficiencia computacional (Huelsenbeck *et al.*, 2002). Para la IB, el modelo seleccionado fue GTR+I+G usando MrModeltest v2.3 (Nylander, 2004), ambos por el *Likelihood Ratio Test* y basados en una búsqueda jerarquizada de modelos cada vez más complejos. Se realizaron dos análisis simultáneos independientes. Las filogenias fueron estimadas con 10 000 000 de generaciones del algoritmo de MCMCMC (Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo) (4 cadenas, temperatura de cadena=0.2), con seis tipos de sustituciones y con tasas de sustitución invariables y variables que siguen la distribución gamma y con igual probabilidad *a priori* de las frecuencias de bases (Prset statefreqpr=dirichlet(1,1,1,1)).

Cuando cada cadena es muestreada, los parámetros del modelo se guardan en un file con extensión *.p, uno por cada análisis independiente. Estos datos pueden ser importados a la mayoría de programas estadísticos, tipo Excel. Al plotear las dos primeras columnas de uno de los archivo con extensión *.p se observa la totalidad de árboles muestreados; sin embargo, sólo se consideran para el análisis los que tienden a la estabilidad, la meseta de la gráfica (2 000 a 100 000 en este caso).

La topología y las longitudes de las ramas son especificadas en un *file* con extensión *.t, similar al caso anterior, uno por cada análisis independiente. Los archivos *.t son árboles y pueden ser importados en programas tipo PAUP*4.ob10 y TreeView1.6.6 (Page, 1996).

Posterior al término de las corridas, es construido un árbol consenso a partir de la regla de la mayoría del 50% y estimando los valores de credibilidad de los nodos con los árboles “estables” en el programa PAUP*4.ob10, importando uno de los archivos con extensión *.t. Sin embargo, este árbol generado no es exportable con la longitud de sus ramas ni los valores de confianza para sus nodos.

Para sumarizar los valores obtenidos producto de las dos corridas independientes usamos el comando sump o sumt, para los archivos con extensión *.p y *.t, respectivamente, considerando en ambos casos sólo los arboles “estables”. Ambos comandos se adicionan en la parte final del block de comandos utilizado para inferir la filogenia. El comando “sump” genera una gráfica de las generaciones *versus* los logaritmos de las probabilidades de los datos, con la que se puede evidenciar si es que se ha

considerado suficientes generaciones de las cadenas y si es que las escogidas como estables, realmente lo son. El comando “sumt” crea tres archivos adicionales. El archivo *.parts, conserva la información de los árboles considerados, probabilidad posterior, longitud de las ramas, entre otros. El archivo *.con incluye dos árboles consenso. Uno de ellos tiene la probabilidad posterior de los clados y longitud de los brazos. El otro árbol solamente contiene las longitudes de los brazos, ambos se leen el TreeView1.6.6. EL tercer archivo generado por el comando sumt es el *.trprobs, que contiene los árboles que fueron usados durante la búsqueda de MCMC, elegidos mediante probabilidad posterior.

NETWORKS

Para visualizar mejor la relación del complejo de especies *B. modestus* se realizaron los Networks. Éstos trabajan con DNA no recombinante y grafican las relaciones inferidas entre haplótipos cercanos, asociándolos por más puntos que las filogenias. Adicionalmente también es posible observar en ellos, datos de frecuencia haplotípica y localidad de las secuencias involucradas (www.fluxus-engineering.com/Network4501_user_guide.pdf). El formato Roehl (*.rdf) requerido, se obtuvo a partir del alineamiento en el programa DnaSP ver.4.50.3. Los análisis de networks se realizaron en el programa Network4.5.0.0 (www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm) usando el algoritmo *Median-Joining* (Bandelt et al., 1999).

ESTIMATIVA DEL TIEMPO DE DIVERGENCIA

El estimado de tiempos de divergencia es obtenido en base a la suposición de una tasa mutacional constante, también llamado reloj molecular. Bajo la asunción de una tasa constante para el marcador COI, se estimaron los tiempos de divergencia para la diversificación del complejo de especies *B. modestus*. Se utilizó para ello, el método del árbol linearizado (Takezaki et al., 2004) en el programa MEGA4.0. Considerando que aun no se dispone de una tasa de mutación calibrada para el genoma mitocondrial de *Bostryx*, ni para otros géneros cercanos, se estimó el tiempo de divergencia con la tasa de sustitución sitio por millón de años de 0.084, valor calculado en *Leptaxis azorica*, pulmonados terrestres que habitan las Islas Azores (Van Riel et al., 2005).

IV. RESULTADOS

DIFERENCIACIÓN CONCHOLÓGICA

En el programa Excel se graficó diámetro mayor vs altura (**Figura 48**) en base a las medidas mostradas en la **Tabla 4**. La variación conchológica de las especies del complejo *B. modestus* empleadas en el desarrollo de esta tesis se presentan en un rango de 24.5 - 13.8 en altura y 14.2 – 7.8 de diámetro mayor. Los individuos de mayor tamaño tanto en diámetro como en altura corresponden a ejemplares de *B. sordidus*. En cuanto a los individuos de *B. scalariformis*, éstos presentan los menores tamaños, y su característica más resaltante es poseer la última vuelta corporal más ancha y corta, contrastando con el resto de su concha, apreciable en un individuo del Cerro El Agua que mostró incremento en su diámetro. Un rango mayor de tamaño muestran los individuos de *B. modestus*, presentándose altamente variables desde grandes y anchos (**Figura 23 - 24**) hasta bastante pequeños y angostos (**Figura 19 - 20**). El ejemplar de mayor tamaño, que fue en dimensiones similar a los *B. sordidus*, fue un ejemplar de la localidad de Paraíso (ind. c6f_1) y los similares en tamaño a los *B. scalariformis* correspondían a la localidad de Picapiedra.

Además del tamaño, los ejemplares de *B. scalariformis* se caracterizan por presentar su superficie ornamentada con costillas longitudinales regulares y ombligo relativamente grande (**Figura 35 - 36**), mucho más evidentes en los ejemplares del cerro El Agua y de Lachay, de la que no se llegó a incluir ningún ejemplar en este estudio. Estas características hacen que *B. scalariformis* sea la especie que mejor logra diferenciarse dentro de las especies de este complejo.

La conchilla de *B. modestus*, en el caso de la población de El Manzano también presenta ligera ornamentación (estrías axiales más notorias) (**Figura 19 - 20**).

En el caso de los extragrupos, *B. turritus* es bastante diferenciable, considerando su relación entre altura y diámetro mayor. En cuanto a *Scutalus* spp., este también es muy distinto, presenta granulaciones puntuales alineadas o no según la especie de *Scutalus*. Lo que más diferencia a *B. conspersus*, es la textura de su concha, ya que no presenta ningún tipo de estria, en dimensiones se asemeja mucho a *B. modestus* y además de ello los diseños en su conchilla son bastante variables.

Tabla 4. Relación de los 29 individuos involucrados en el presente estudio, se indica en cada caso, especie, localidad, código de individuo, altura (H), diámetro mayor (D>), altura de la abertura (h), ancho de la abertura (d) y número de vueltas (#vueltas).

	Especie	Localidad	Individuo	H	D>	h	d	#vueltas
1	<i>B. modestus</i>	Lomas de Atocongo	c74f_1	20.44	10.80	10.82	6.68	6.7
2	<i>B. modestus</i>	Lomas de El Manzano	c11g_5	15.72	7.80	8.60	5.44	6.5
3	<i>B. modestus</i>	Lomas de El Manzano	c75f_2	16.90	8.92	8.54	5.00	6.4
4	<i>B. modestus</i>	Lomas de El Manzano	c9g_3	19.80	10.46	10.30	6.20	6.8
5	<i>B. modestus</i>	Lomas de Paraíso	c6f_1	24.30	12.46	11.80	7.50	7.4
6	<i>B. modestus</i>	Lomas de Paraíso	c7f_2	19.90	10.38	9.48	6.24	7.2
7	<i>B. modestus</i>	Lomas de Picapiedra -pueblo	30f_2	14.86	9.20	9.10	5.94	6.0
8	<i>B. modestus</i>	Lomas de Picapiedra -pueblo	c31f_3	18.36	10.02	9.30	6.00	6.9
9	<i>B. modestus</i>	Lomas de Picapiedra	c79e_59	19.00	10.10	9.10	5.74	7.1
10	<i>B. modestus</i>	Lomas de Picapiedra	c80e_78	15.18	8.94	8.68	5.50	6.2
11	<i>B. sordidus</i>	Lomas de Iguanil	c14a_15	23.10	14.00	12.76	9.10	6.7
12	<i>B. sordidus</i>	Valle de Santa Eulalia	c73e_1	21.04	11.46	11.90	7.14	6.6
13	<i>B. sordidus</i>	Valle de Santa Eulalia	c74e_2	23.50	12.20	11.00	7.12	6.8
14	<i>B. sordidus</i>	Valle de Santa Eulalia	c75e_3	24.06	14.22	13.46	8.70	6.7
15	<i>B. sordidus</i>	Valle de Santa Eulalia	c76e_4	19.00	11.60	10.00	7.00	6.4
16	<i>B. sordidus</i>	Valle de Santa Eulalia	c77e_5	22.10	12.00	10.10	8.18	6.7
17	<i>B. scalariformis</i>	Cerro El Agua (Km 115)	c3a_3a	15.32	11.48	7.00	5.09	5.9
18	<i>B. scalariformis</i>	Cerro El Agua (Km 115)	c84_b	14.00	9.76	8.90	6.60	5.9
19	<i>B. scalariformis</i>	Lomas de Pasamayo	c75_3	16.00	9.60	8.50	5.70	6.2
20	<i>B. scalariformis</i>	Lomas de Pasamayo	c81_9	13.90	9.00	7.00	2.68	6.0
21	<i>B. scalariformis</i>	Lomas de Pasamayo	c79_7	15.70	9.00	7.84	6.32	6.2
22	<i>B. conspersus</i>	Lomas de Atocongo	c23f_12	17.20	10.00	9.72	6.68	5.9
23	<i>B. turritus</i>	Valle de Santa Eulalia	c1f_1	14.00	5.56	5.00	3.44	9.2
24	<i>B. turritus</i>	Valle de Santa Eulalia	c4f_4	16.46	5.90	5.00	3.26	9.8
25	<i>S. versicolor</i>	Lomas de Mongón	c11_8	29.90	18.30	17.74	12.20	6.0
26	<i>S. versicolor</i>	Lomas de Mongón	c12_4	36.44	19.76	22.00	14.10	6.2
27	<i>S. versicolor</i>	Lomas de Mongón	c41_54	24.80	13.70	15.30	10.50	5.9
28	<i>S. versicolor</i>	Lomas de Mongón	c42_7	31.06	16.88	17.82	11.78	6.0
29	<i>Scutalus</i> sp.	Lomas de El Manzano	c83f_2	38.02	22.30	20.96	14.56	6.5

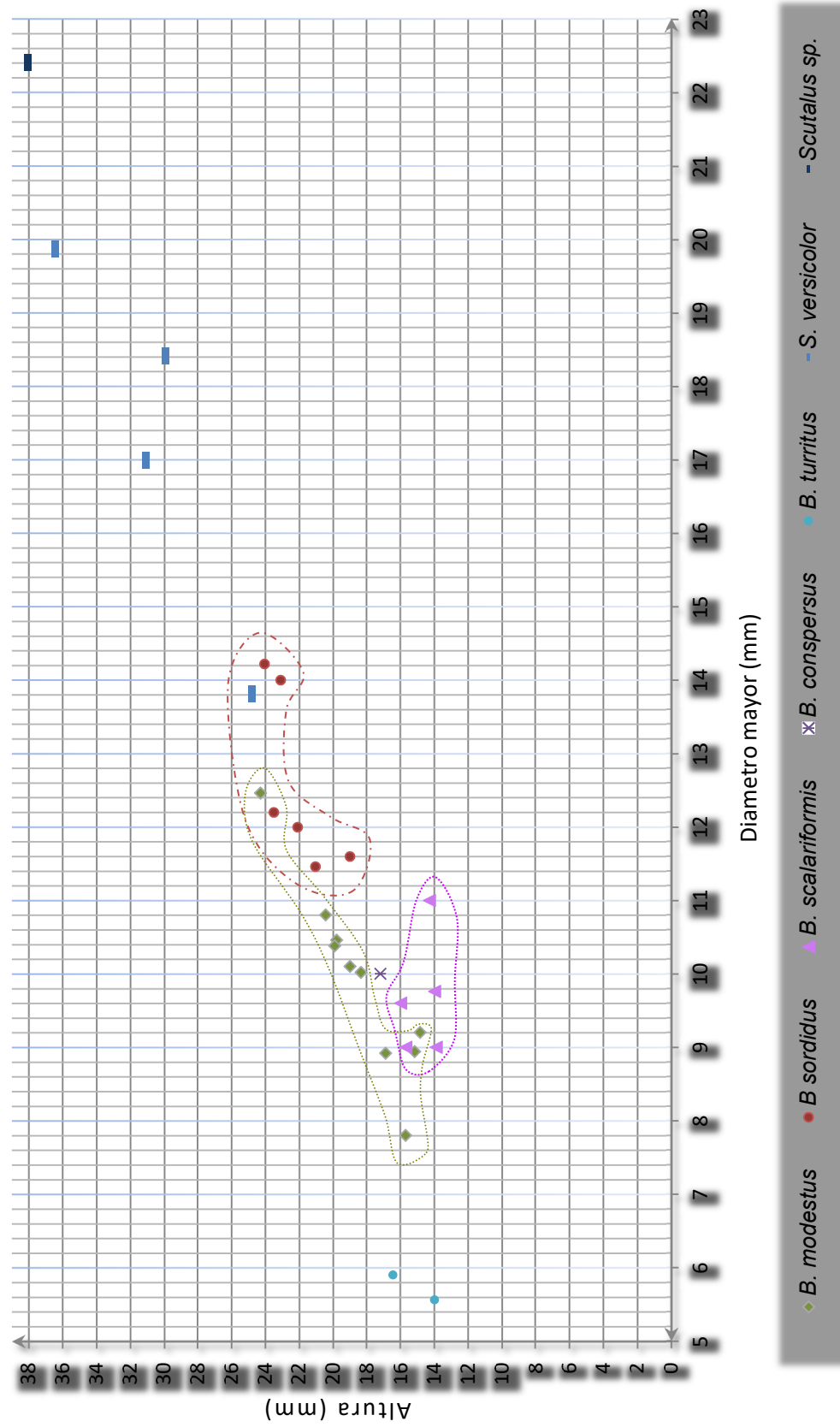


Figura 48. Distribución de tamaños de los 29 individuos involucrados en el presente trabajo de tesis separados por especies. Nótese que las especies del complejo *B. modestus* (*B. modestus*, *B. scalariformis* y *B. conspersus*) se mantienen en un rango 24.5 – 13.8 en altura y 14.2 - 7.8 de diámetro.

EFICIENCIA EN LA OBTENCIÓN DE AMPLICONES COI

De los 149 individuos trabajados durante el desarrollo de la tesis, 35 dieron resultados positivos con banda única para COI (**Tabla 3**), 28 de los cuales procedían de colecciones recientes. En el caso de las muestras de colecciones científicas considerando sólo las muestras exitosas amplificando 16S rRNA, se consiguió banda única para COI en aproximadamente la mitad. Las **Tablas 5-7** muestran en detalle la antigüedad de la muestra y el año de trabajo por especie.

Las especies *B. limensis* (= *B. sordidus*) de La Paloma y *B. laurenti* (sinónimo de *B. modestus*), no se colectaron recientemente por lo que las muestras trabajadas procedían únicamente de colecciones científicas con más de 5 años de antigüedad (**Tabla 8**). Diferente es el caso de *B. turritus* y *Scutalus* sp., que sólo se trabajó con muestras colectadas en el año 2008 (**Tabla 9**).

Además de estas especies, en la presente tesis también se consideran cinco secuencias de *B. scalariformis* y cuatro secuencias de *Scutalus versicolor*, obtenidas por el equipo de trabajo del laboratorio de Sistemática molecular y Filogeografía de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), como parte de otros proyectos de investigación.

Tabla 5. Total de individuos de *B. modestus* trabajados, indicando número de extracciones y cantidad de amplificaciones positivas con ambos marcadores (16S rRNA y COI), clasificados por año de trabajo. La procedencia de estas muestras se extiende a las poblaciones de Manzano, Salinas de Huacho, Pucará, Lachay, Atocongo, Picapiedra, Manchay Bajo y Paraíso.

Año de trabajo Antigüedad de la muestra	Individuos		N° Extracciones		Amplificados positivos			
					16S rRNA		COI	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
Menor a un mes	0	16	0	21	0	16	0	16
Mayor a 5 años	21	18	32	29	1	8	0	4

Tabla 6. Total de individuos de *B. sordidus* trabajados, indicando número de extracciones y cantidad de amplificaciones positivas con ambos marcadores (16S rRNA y COI), clasificados por año de trabajo. La procedencia de estas muestras se extiende a las poblaciones de Santa Eulalia, Iguanil, Huertos de Manchay, Carabayllo, Ancón y Amancaes.

Año de trabajo Antigüedad de la muestra	Individuos		N° Extracciones		Amplificados positivos			
					16S rRNA		COI	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
Menor a un mes	0	5	0	5	0	5	0	5
Mayor a 5 años	11	16	16	18	2	4	1	0

Tabla 7. Total de individuos de *B. conspersus* trabajados, indicando número de extracciones y cantidad de amplificaciones positivas con ambos marcadores (16S rRNA y COI), clasificados por año de trabajo. La procedencia de estas muestras se extiende a las poblaciones de San Lorenzo, Manzano, Lachay, Iguanil, Carabayllo, Atocongo y Atiquipa.

Año de trabajo Antigüedad de la muestra	Individuos		N° Extracciones		Amplificados positivos			
					16S		COI	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
Menor a un mes	0	7	0	7	0	2	0	1
Mayor a 5 años	16	11	17	15	4	6	0	0

Tabla 8. Total de individuos de *B. laurenti* y *B. limensis* trabajados, de La Paloma y la isla San Lorenzo, respectivamente. Se indica número de extracciones y cantidad de amplificaciones positivas con ambos marcadores (16S rRNA y COI).

Especie \ Año de trabajo	Individuos		N° Extracciones		Amplificados positivos			
					16S rRNA		COI	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
<i>B. laurenti</i>	5	6	5	0	0	0	0	0
<i>B. limensis</i>	6*	16	6	23	0	2	0	2 [§]

(*)Mismos 6 individuos que fueron trabajados el 2008. (°)No se logró obtener volumen suficiente para secuenciamiento

Tabla 9. Total de individuos de *B. turrinus* y *Scutalus* sp. trabajados, del valle de Santa Eulalia y las Lomas de El Manzano, respectivamente. Se indica número de extracciones y cantidad de amplificaciones positivas con ambos marcadores (16S rRNA y COI).

Especie \ Año de trabajo	Individuos	N° Extracciones	Amplificados positivos	
			16S rRNA	COI
	2008	2008	2008	2008
<i>B. turrinus</i>	5	5	5	5
<i>Scutalus</i> sp.	2	2	1	1

ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

El alineamiento múltiple de 29 secuencias, que incluye especies del complejo *B. modestus* y los extragrupos, resultó en 706 sitios incluido los primers HCO y LCO, sin presencia de *indels*². El 62.74 % corresponde a sitios invariantes y el porcentaje restante a 263 loci polimórficos, 215 de los cuales eran informativos y 48 sitios presentaban *singletons*³ (Tabla 10). En total se encontraron 394 sustituciones distribuidas en 257 transiciones y 137 transversiones. La composición de bases nucleotídicas por especie mostró ser poco variable entre ellas con el porcentaje de AT en todos los casos entre 63.76 – 66.29 % (Tabla 11). Se indica en la Tabla 12 las posiciones variables.

Tabla 10. Total de sitios variables o monomórficos, dentro de los sitios variables se indican informativos y *singletons*

	Cantidad de variantes			Totales
	2	3	4	
Sitios informativos	116	72	27	215
<i>Singletons</i>	43	5	0	48
Suma de posiciones variables				263
Posiciones monomórficas				443
Total de sitios				706

Tabla 11. Composición nucleotídica de bases por especie, los datos se muestran en porcentaje.

	<i>Bostryx scalariformis</i>	<i>Bostryx sordidus</i>	<i>Bostryx modestus</i>	<i>Bostryx turritus</i>	<i>Bostryx conspersus</i>	<i>Scutalus versicolor</i>	<i>Scutalus sp.</i>
C	15.33	14.9	15.86	14.73	14.16	13.95	13.31
T	49.2	40.49	39.04	38.81	39.24	39.24	39.94
A	25.38	25.4	24.72	26.06	25.5	26.77	25.78
G	19.09	19.22	20.38	20.4	21.1	20.04	20.96

² Evento de inserción o delección que trae como consecuencia expansión y/o contracción en la longitud de la secuencia.

³ Sitio con variación única, no compartida por más de un individuo.

[illegible]

...(Continua)

[illegible]

HAPLOTIPOS

Las 29 secuencias se colapsaron en 19 haplotipos (**Tabla 13**), 18 de ellos fueron únicos por especie, excepto uno (mdPiL) que resultó compartido por tres *B. sordidus* de Santa Eulalia y un *B. modestus* de Picapiedra – pueblo. En la **Tabla 14** se observan algunas estadísticas dentro de las especies del complejo *B. modestus*. La mayor diversidad nucleotídica se observa en *B. modestus*. *B. sordidus*, con sólo dos localidades de colecta en el presente estudio, tuvo la menor diversidad nucleotídica.

Tabla 13. Distribución de los haplotipos del marcador COI en todas las especies en estudio, sus respectivas localidades de colecta, se indica también el número de ejemplares (N) por localidad.

Especie \ Localidad	N	Haplotipos																		
		1 mdPar	2 mdAt	3 mdPiL	4 mdPiP	5 mdMz1	6 mdMz2	7 mdMz3	8 sifg	9 srSTMd	10 srS2	11 sc115A	12 sc115B	13 scPs1	14 scPs2	15 turSt	16 cnsAt	17 vrMon	18 vrMon1	19 sculMz
<i>Bostryx modestus</i>																				
Lomas del Paraíso	2																			
Lomas de Abocongo	1		1																	
Lomas de Picapiedra	2			1																
Lomas de Picapiedra - pueblo	2				2															
Lomas de el Manzano	3					1	1	1												
<i>Bostryx sordidus</i>																				
Lomas de Iguañil	1							1												
Valle de Santa Eulalia	5								3	2										
<i>Bostryx scalariformis</i>																				
Km 115	2										1	1								
Lomas de Pasamayo	3												1	1	2					
<i>Bostryx turritus</i>																				
Valle de Santa Eulalia	2														2					
<i>Bostryx conpersus</i>																				
Lomas de Abocongo	1															1				
<i>Scutalus versicolor</i>																				
Mongon	2																	2		
<i>Scutalus proteus</i>																				
Mongon	2																		2	
<i>Scutalus</i> sp.																				
Lomas de el Manzano	1																			1

Tabla 14. Diversidad nucleotídica (π) y diversidad haplotípica (Hd).

	<i>B. modestus</i>	<i>B. sordidus</i>	<i>B. scalariformis</i>	<i>Scutalus</i> spp.
π	0.956 \pm 0.06	0.733 \pm 0.16	0.900 \pm 0.16	0.800 \pm 0.02
Hd	0.122 \pm 0.02	0.033 \pm 0.02	0.076 \pm 0.01	0.036 \pm 0.02

CALIDAD DE LOS DATOS

El análisis del número de mutaciones (transiciones y transversiones) con respecto a la distancia genética a pares para las especies del complejo *B. modestus* (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*) muestra a las transiciones alcanzando un ligero plateau alrededor del 20%, lo que significa que están alcanzando la saturación (**Figura 49**). Al evaluar los datos sin considerar el haplotipo divergente de *B. modestus* (mdPiL) (Tabla 19, ver más adelante), las líneas de transiciones y transversiones se muestran rectas (**Figura 50**) lo que indica que están lejos de la saturación. Al analizar el alineamiento múltiple incluyendo el grupo externo, se evidencia también un grado de saturación en las transiciones (**Figura 51**), casi semejante al producido por el haplotipo divergente de *B. modestus*. Para evitar el sesgo que podía dar el usar los datos en bruto, los análisis filogenéticos fueron realizados con la corrección de distancias según el modelo de substitución nucleotídica obtenido por el Model Test 3.7.

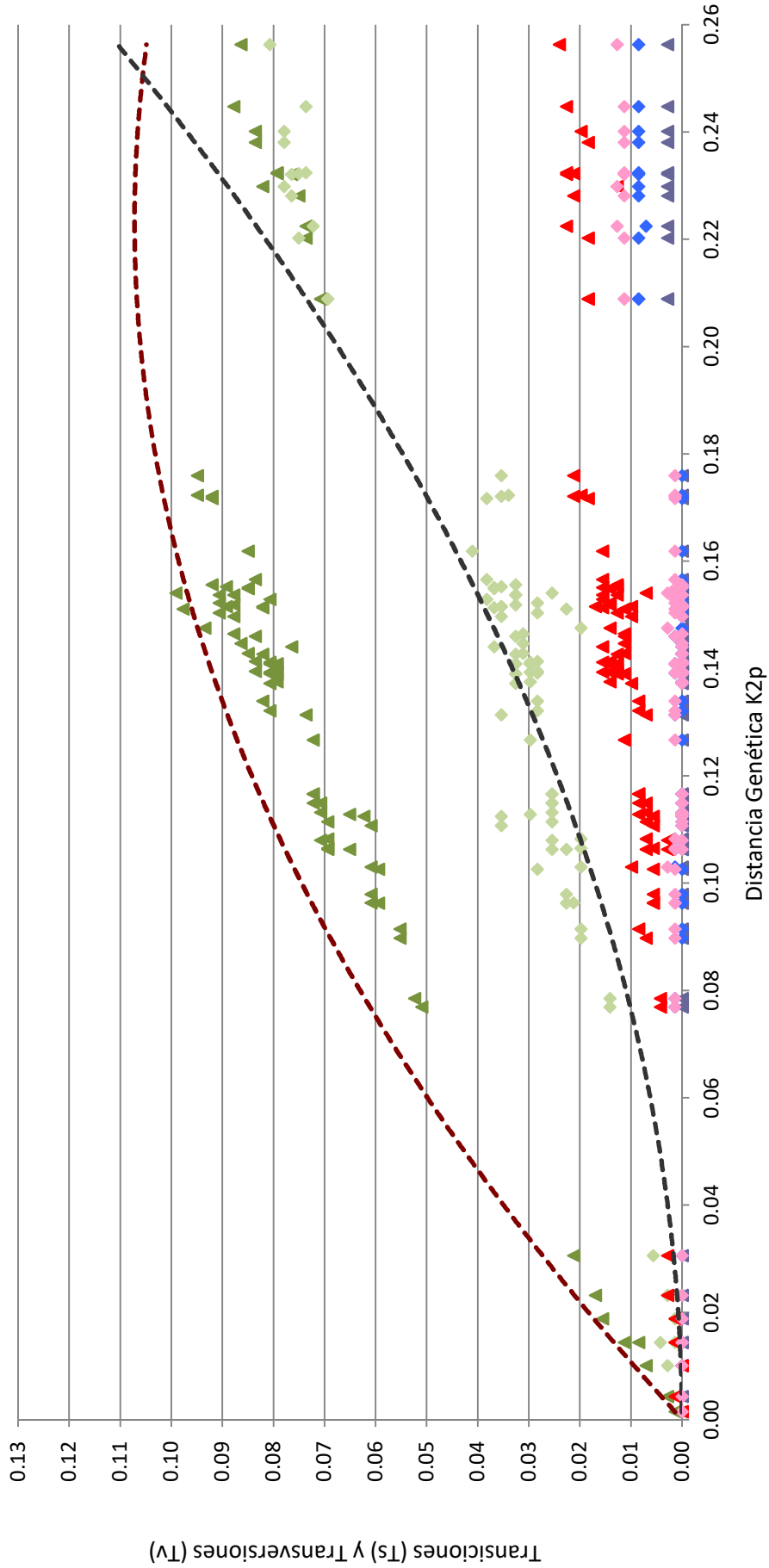


Figura 49. Relación de la variación de transiciones (Ts) y transversiones (Tv) en relación a la distancia genética según el modelo de sustitución nucleotídica K-2p del gen COI considerando los haplotipos que forman parte del complejo *B. modestus*. En la imagen se observan además de los promedios de Ts (- - - -) y Tv (- - - -), cada posición por separado: Ts y Tv de primera posición ▲ y ◆ , respectivamente. Ts y Tv de segunda posición, ▲ y ◆ , respectivamente. Ts y Tv de tercera posición, ▲ y ◆ .

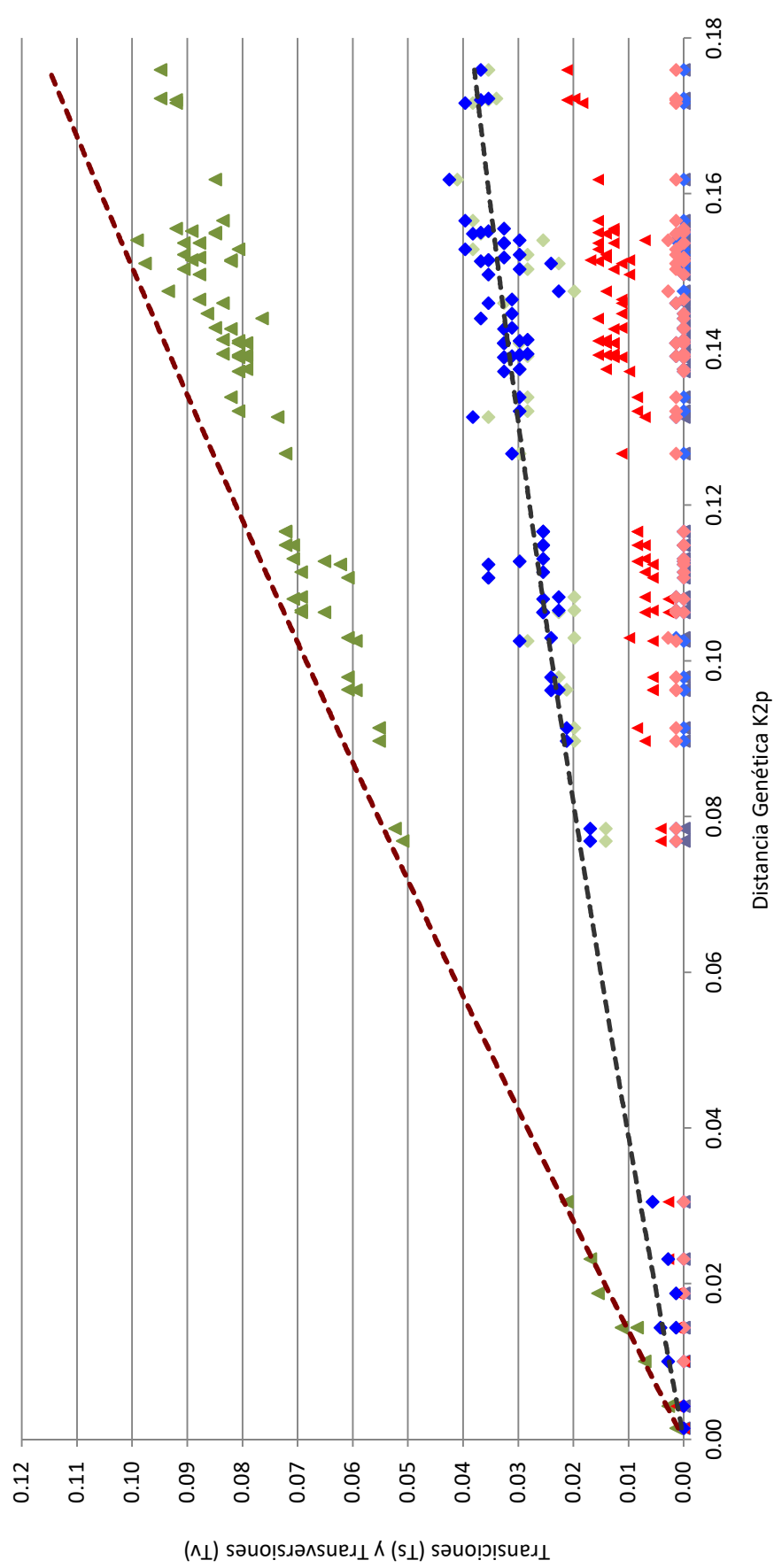


Figura 50. Relación de la variación de transiciones (Ts) y transversiones (Tv) en relación a la distancia genética según el modelo de sustitución nucleotídica K-2p del gen COI considerando los haplotipos monofileticos del complejo *B. modestus*, excluyendo la secuencia divergente. En la imagen se observan además de los promedios de Ts (-----) y Tv (-----), cada posición por separado: Ts y Tv de primera posición (◆ y ▲, respectivamente. Ts y Tv de segunda posición, ▲ y ◆, respectivamente. Ts y Tv de tercera posición, ▲ y ◆.

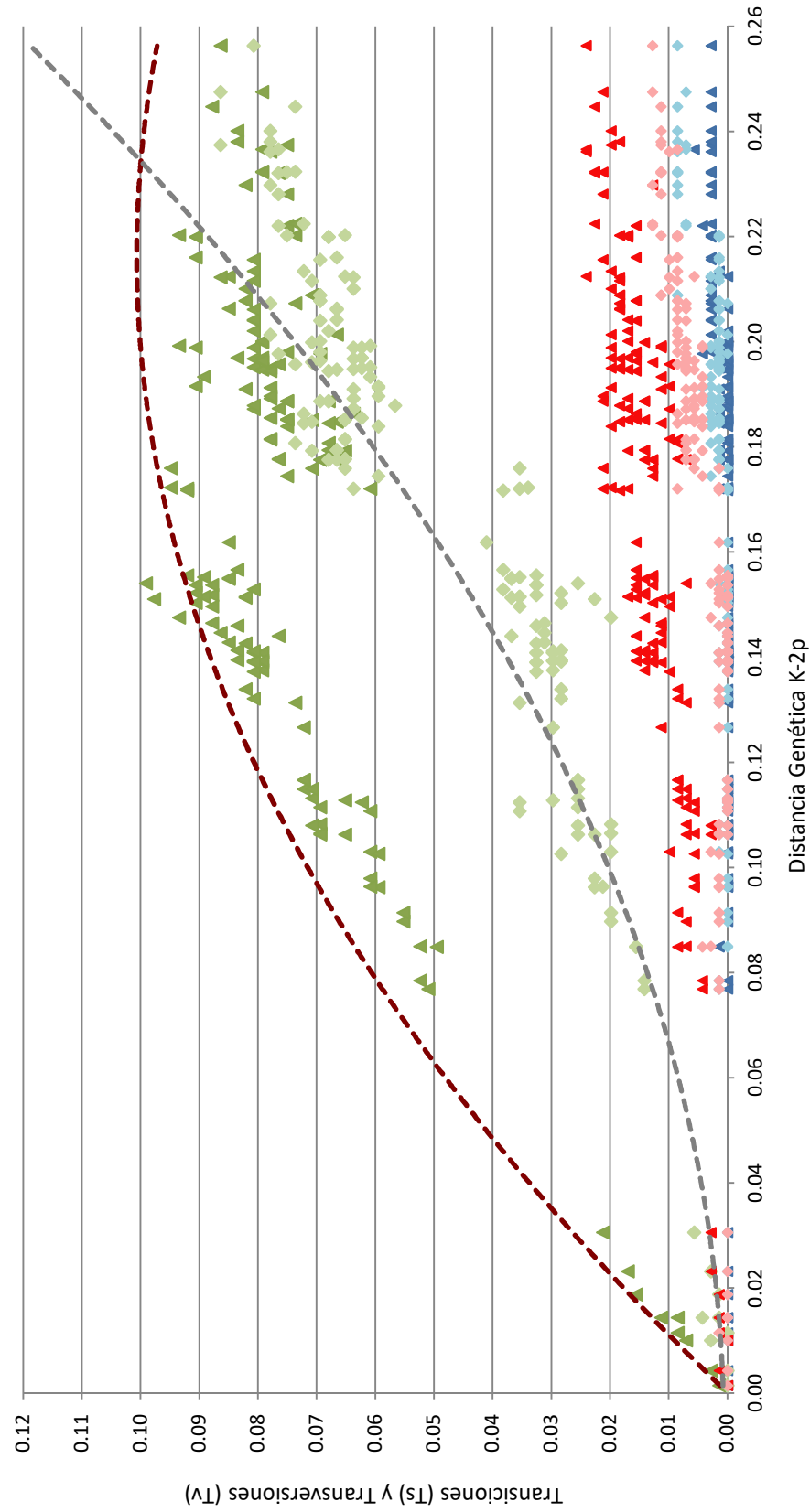


Figura 51. Relación de la variación de transiciones (Ts) y transversiones (Tv) en relación a la distancia genética según el modelo de sustitución nucleotídica K-2p del gen COI considerando los 19 haplotipos involucrados en el estudio. En la imagen se observan además de los promedios de Ts (- - - - -) y Tv (- - - - -), cada posición por separado: Ts y Tv de primera posición (▲ y ◆, respectivamente. Ts y Tv de segunda posición, ▲ y ◆, respectivamente. Ts y Tv de tercera posición, ▲ y ◆.

ANÁLISIS DE DISTANCIAS

En el 72.2% de los casos, en la matriz incluyendo los 19 haplotipos, el más distante resultó el haplotipo mdPiL, que corresponde a un ejemplar de *B. modestus* de las Lomas de Picapiedra (de rojo en la matriz de distancias), seguido por los extragrupos (**Tabla 15**). Si excluimos este haplotipo, las mayores distancias dentro del complejo de especies *B. modestus* estarían entre los *B. modestus* de Paraíso (mdPar), y los *B. modestus* de Manzano y Atocongo (mdMz1, mdMz2, mdMz3 y mdAt) (en verde). En la **Figura 52** se observa gráficamente las relaciones de los haplotipos considerando distancias genéticas, encontrándose 3 grupos en los que se separó el complejo *B. modestus*, según sus distancias genéticas: Dos mayores, grupo A y grupo B, asociados entre ellos y el haplotipo mdPiL formando el “grupo” C.

Al asociar los haplotipos cercanos (srSt y srStmd, sc115A y B, mdMz1, mdMz2, mdMz3 y mdAt) y calcular las distancias a pares excluyendo al haplotipo mdPiL de *B. modestus* de las Lomas de Picapiedra, se encontró que la mayoría se mantenían entre 0.1 y 0.2, y que las distancias que sobrepasaban este rango se generaban al comparar los *B. modestus* de Paraíso con los otros miembros del complejo (**Tabla 16** y **Figura 53**). En el cálculo de las distancias dentro y entre (**Tabla 17** y **Tabla 18**, respectivamente) los tres “grupos”, incluyendo además los grupos externos, se observa mayor distancia entre el “grupo” C (mdPiL) y el grupo B, que entre el grupo C y el extragrupo *Scutalus*.

Adicionalmente, también se obtuvo el promedio de distancias intragenérica e intraespecífica. El promedio de distancias intragenérica del género *Bostryx* resultó ser al menos cuatro veces mayor que el *Scutalus* (**Figura 54**). En cuanto a los promedios intraespecífica, *B. modestus* resultó con el mayor promedio de distancias, duplicando incluso el promedio de *B. scalariformis* y superando en cuatro veces el promedio de *B. sordidus* y (**Figura 55**).

Tabla 15. Matriz de distancias genéticas de los 19 haplotipos incluidos en el estudio usando las distancias corregidas con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2p (corrección gamma de 0.33575) (sobre la diagonal) y el número de diferencias (bajo la diagonal). Nótese que la secuencia más divergente de todas corresponde al haplotipo mdPiL (*Bostryx modestus* de las Lomas de Picapiedra). Excluyendo al haplotipo mdPiL, en verde, se señala las cuatro mayores distancias dentro del complejo *Bostryx modestus*.

Especie	turSt	vrMon	vrMon1	scuMz	srStmd	srSt	scPs2	sc15A	sc15B	scPs1	srIlg	mdPiP	mdPar	mdMz1	mdMz2	mdMz3	mdMz-At	cnsAt	mdPiL
<i>B. turrilus</i>		0.267	0.279	0.252	0.283	0.283	0.299	0.296	0.282	0.293	0.260	0.289	0.352	0.301	0.305	0.318	0.320	0.327	0.405
<i>S. versicolor</i>	112		0.012	0.105	0.264	0.264	0.268	0.274	0.265	0.306	0.261	0.308	0.303	0.285	0.288	0.305	0.293	0.316	0.404
<i>S. versicolor</i>	115	8		0.105	0.289	0.289	0.302	0.273	0.264	0.315	0.282	0.317	0.322	0.313	0.306	0.335	0.311	0.331	0.433
<i>Scutalus</i> sp.	108	56	56		0.268	0.268	0.281	0.297	0.287	0.277	0.264	0.282	0.350	0.309	0.308	0.318	0.313	0.308	0.365
<i>B. sordidus</i> -		111	117	112		0.001	0.093	0.154	0.151	0.122	0.139	0.144	0.185	0.207	0.202	0.220	0.198	0.336	0.333
<i>B. modestus</i>	115		117	112	1		0.096	0.157	0.154	0.125	0.142	0.147	0.189	0.211	0.206	0.224	0.202	0.336	0.333
<i>B. sordidus</i>	115	111	117	112	51	52		0.143	0.140	0.133	0.139	0.181	0.232	0.199	0.202	0.212	0.202	0.344	0.368
<i>B. scalariformis</i>	118	113	121	116	74	75	70		0.004	0.115	0.157	0.198	0.228	0.205	0.200	0.230	0.204	0.333	0.410
<i>B. scalariformis</i>	117	113	113	118	74	74	69	3		0.112	0.148	0.195	0.224	0.201	0.196	0.226	0.200	0.328	0.416
<i>B. scalariformis</i>	114	111	111	116	73	74	67	60	59		0.131	0.174	0.222	0.230	0.224	0.243	0.233	0.351	0.385
<i>B. scalariformis</i>	116	121	123	115	63	64	67	75	72	67		0.149	0.229	0.215	0.23	0.232	0.234	0.311	0.361
<i>B. sordidus</i>	109	110	115	111	69	70	69	88	87	81	73		0.123	0.224	0.207	0.231	0.223	0.345	0.382
<i>B. modestus</i>	117	121	123	115	72	73	84	95	94	92	94	63		0.272	0.271	0.268	0.281	0.356	0.464
<i>B. modestus</i>	129	120	124	130	84	85	96	95	88	97	92	95	106		0.020	0.015	0.015	0.361	0.395
<i>B. modestus</i>	118	115	121	120	90	91	88	89	87	96	96	91	106	13		0.033	0.010	0.374	0.396
<i>B. modestus</i>	119	116	120	120	89	90	89	88	87	96	96	91	106	10	21		0.025	0.371	0.433
<i>B. modestus</i>	122	120	126	122	94	95	92	96	95	101	97	97	106	10	7	16		0.371	0.393
<i>B. modestus</i>	122	117	121	121	88	89	89	89	88	98	97	95	108	10	133	133	133	0.371	0.409
<i>B. conspersus</i>	125	124	127	122	127	127	128	126	125	129	122	129	131	131	133	133	133	0.371	0.409
<i>B. modestus</i>	142	143	148	135	128	128	135	143	144	139	134	138	152	140	140	146	140	142	

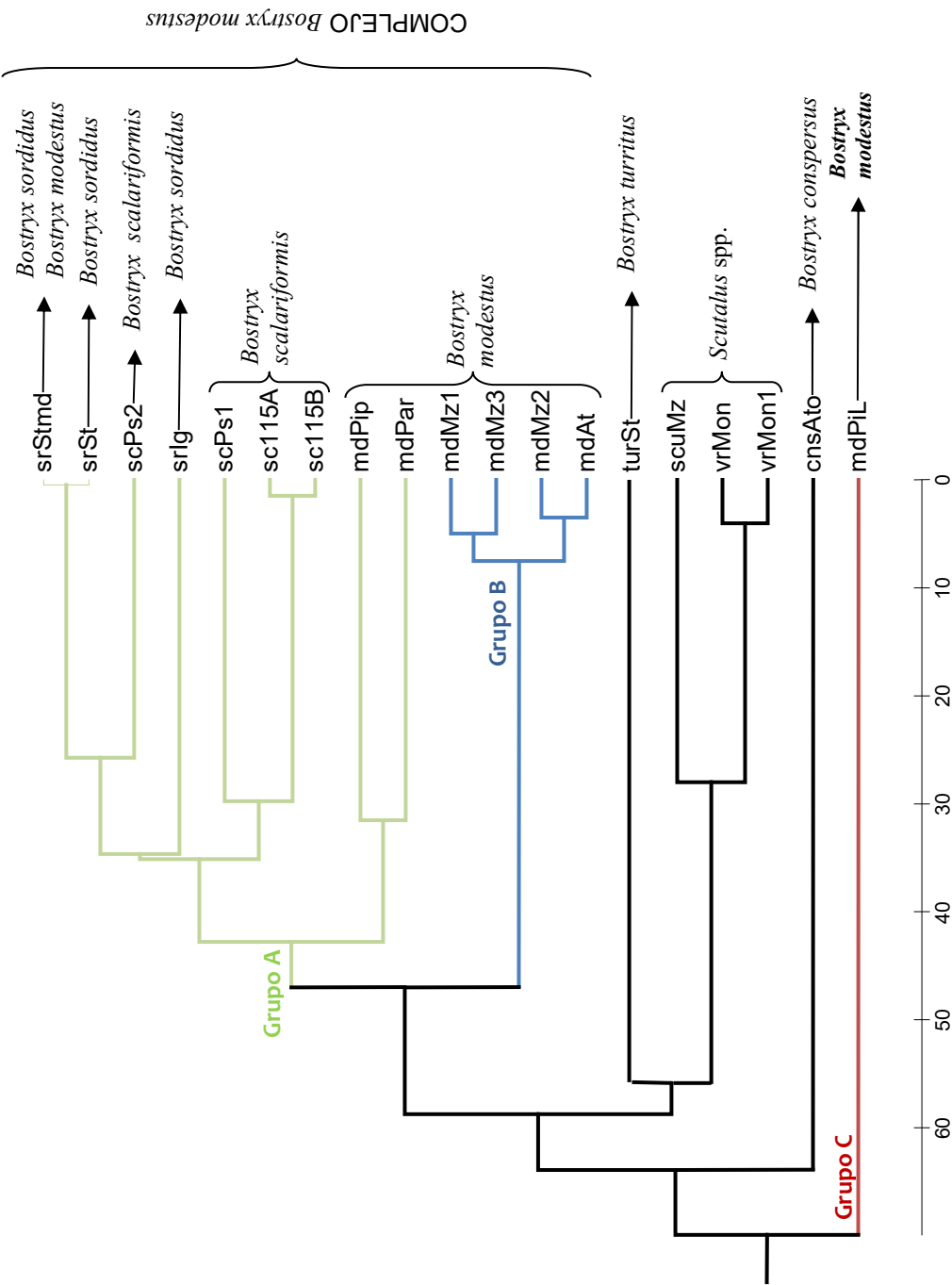


Figura 52. Árbol UPGMA de los 19 haplotipos involucrados en el presente estudio, generado en base a la matriz de distancia a pares. Se observan de diferentes colores los tres principales grupos en los que se distribuyen las distancias del complejo de especies *B. modestus*. En verde, el grupo A, en Azul el Grupo B y en rojo la secuencia de *B. modestus* de las Lomas de Picapiedra (Grupo C).

Tabla 16. Matriz de distancias genéticas usando las distancias corregidas con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2p ($\alpha=0.33575$) (sobre la diagonal) y el número de diferencias (bajo la diagonal) producto de asociar los haplotipos más cercanos dentro del clado monofilético del complejo *B. modestus* (srSt y srStmd, sc115A y sc115B, además de mdMz1, mdMz2, mdMz3 y mdAt en srSt, sc115 y mdMz-At, respectivamente). Nótese que los valores más divergentes corresponden al haplotipo mdPar (*B. modestus* de las Lomas de Paraíso).

Especie		srSt	scPs2	sc115	scPs1	srlg	mdPip	mdPar	mdMz-At
<i>B. sordidus</i> - <i>B. modestus</i>	srSt		0.094	0.151	0.123	0.139	0.144	0.187	0.198
<i>B. scalariformis</i>	scPs2	51.0		0.139	0.133	0.139	0.181	0.232	0.194
<i>B. scalariformis</i>	sc115	72.0	68.0		0.111	0.150	0.194	0.224	0.196
<i>B. scalariformis</i>	scPs1	63.0	67.0	58.0		0.131	0.174	0.222	0.223
<i>B. sordidus</i>	srlg	69.0	69.0	72.0	67.0		0.149	0.229	0.218
<i>B. modestus</i>	mdPip	72.0	84.0	86.0	81.0	73.0		0.123	0.211
<i>B. modestus</i>	mdPar	84.0	96.0	93.0	92.0	94.0	63.0		0.263
<i>B. modestus</i>	mdMz-At	83.8	83.1	82.1	91.6	89.1	88.1	100.1	

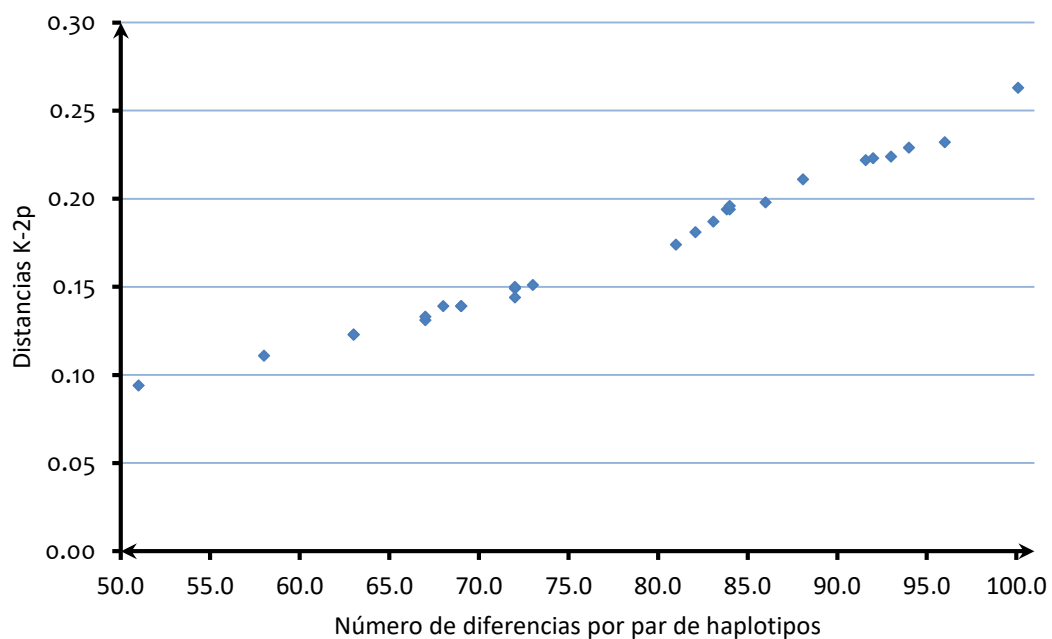


Figura 53. Valores de distancias corregidas para el número de mutaciones que diferencia a parejas de haplotipos (Ver **Tabla 16**)

Tabla 17. Promedio de distancias genéticas dentro de cada grupo usando distancias corregidas con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2p ($\alpha = 0.33575$) y número de diferencias.

	Nº diferencias	K-2p
Grupo A	70.5	0.149
Grupo B	12.8	0.020
Grupo C	No calculable	

Tabla 18. Matriz de los “grupos” que forman parte del complejo de especies *B. modestus*. Distancias genéticas usando las distancias corregidas con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2p ($\alpha = 0.33575$) (sobre la diagonal) y con el número de diferencias (bajo la diagonal). Nótese que la distancia del Grupo C con un extragrupo es incluso menor a la distancia al Grupo B.

	turSt	Scu	Grupo A	Grupo B	cnsAt	Grupo C
turSt		0.229	0.218	0.301	0.327	0.405
Scu	91.7		0.175	0.260	0.281	0.363
Grupo A	81.4	61.0		0.137	0.263	0.309
Grupo B	113.8	93.5	52.3		0.359	0.394
cnsAt	125.0	104.3	91.9	126.1		0.409
Grupo C	142.0	122.0	102.6	135.1	142.0	

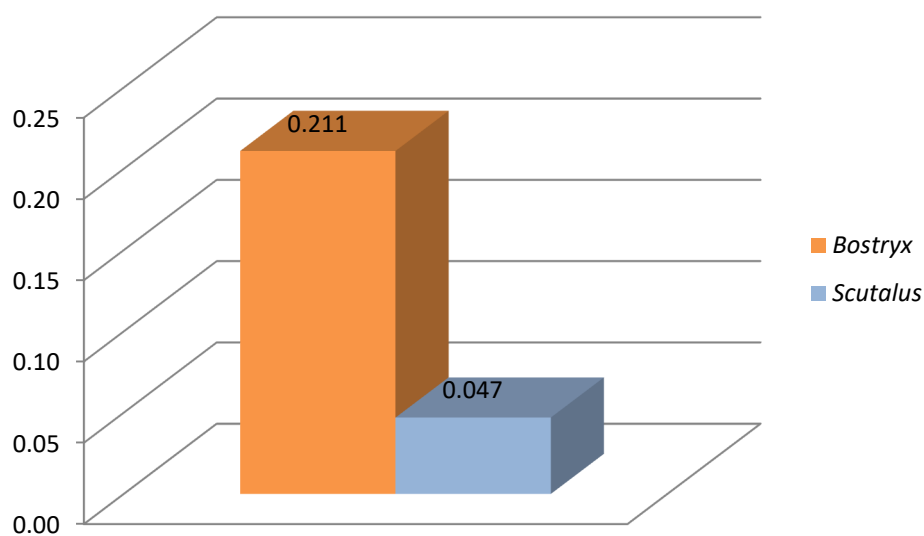


Figura 54. Promedio de distancias (K-2p) intragenéticas.

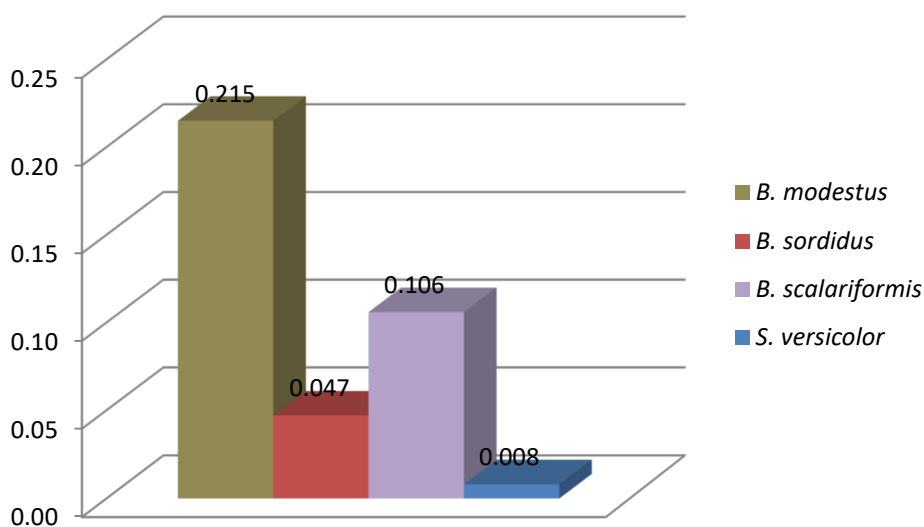


Figura 55. Promedio de distancias (K-2p) intraespecíficas.

En las especies restantes no se contó con variación suficiente.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Basados en los cuatro métodos de reconstrucción de filogenias especificados anteriormente, se obtuvieron cuatro árboles filogenéticos usando el marcador COI, con 14 haplotipos pertenecientes al complejo de especies *B. modestus* y cinco haplotipos como grupos externos. Salvo algunos nodos no resueltos, las topologías de todos los árboles resultaron bastante semejantes.

En las filogenias obtenidas mediante el método de NJ (**Figura 56**), al igual que con los métodos de optimización, MP (**Figura 57**), ML (**Figura 58**) e IB (**Figura 59**), se agrupa al género *Bostryx* con 100 % de soporte estadístico. Por fuera, se encuentran las especies del género *Scutalus*, quedando *Scutalus* sp. (scuMz) de las Lomas de El Manzano basal a un grupo monofilético formado por las secuencias de *Scutalus versicolor* (vrMon – vrMon1) de las Lomas de Mongón.

Dentro del género *Bostryx* (clado *Bostryx*) existe un agrupamiento fuertemente soportado (>75%) de 13 de los 14 haplotipos del complejo de especies *B. modestus*, dejando por fuera a un individuo de *B. modestus* de las Lomas de Picapiedra (mdPiL), a *B. conspersus* de las Lomas de Atocongo (mdAt) y a *B. turritus* (turSt) del Valle de Santa Eulalia (**Figuras 55-59**).

§ *Bostryx modestus*

Excluyendo la secuencia divergente de *B. modestus* de las Lomas de Picapiedra, la especie *B. modestus* quedó separada en 3 partes. Una de ellas formando un grupo monofilético, incluyendo cuatro haplotipos cercanos entre si, de El Manzano (mdMz1-3) y Atocongo (mdAt). Otra, representada por haplotipos de Picapiedra y Paraíso que formaron asimismo un grupo monofilético. Finalmente, también se le encuentra compartiendo un mismo haplotipo con *B. sordidus* del Valle de Santa Eulalia, formando parte del clado de *B. sordidus*. Estos dos últimos grupos, aunque distantes, quedaron más en relación a *B. sordidus* y *B. scalariformis*. La especie *B. modestus* resultó polifilética.

§ *Bostryx sordidus*

Los haplotipos de *B. sordidus* del Valle de Santa Eulalia, formaron un clado monofilético fuertemente soportado. Sin embargo, para la especie *B. sordidus*, se tiene además un haplotipo de Iguañil que no llega a asociarse a ningún otro haplotipo, mas sí permanece en

el clado “mod-sor-sca”, hermano al clado “mdMzAt”. La especie *B. sordidus* resultó en un árbol polifilético.

§ *Bostryx scalariformis*

De los cuatro haplotipos de *B. scalariformis*, tres de ellos presentes en dos localidades, se asociaron en un grupo monofilético con alto valor estadístico en los árboles NJ e IB. El haplotipo restante, que correspondía a la localidad de Pasamayo, se mostró más en relación a los haplotipos de *B. sordidus*, resultando la especie *B. scalariformis*, también en un grupo polifilético.

NETWORKS

Las relaciones filogenéticas entre grupos cercanamente relacionados pueden ser hasta mejor evidenciadas por la metodología de *networks* (redes haplotípicas). Al efectuar el *network* de los 14 haplotipos del complejo de especies *B. modestus* (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*) junto con los 5 haplotipos del grupo externo se observan al haplotipo mdPiL separado por una gran distancia, incluso mayor que la evidenciada con *B. turritus*, *B. conspersus* y *Scutalus* spp. (Figura 60 - 61).

Al hacer el análisis de *networks* de los haplotipos correspondientes a *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*, sin considerar el haplotipo divergente de *B. modestus* no se observó la formación de grupos monofiléticos por especie. Se formaron cuatro clados bien definidos. Dos de ellos corresponden a *B. modestus* (mdMz-At de El Manzano y Atocongo, y mdPiP-Par de Picapiedra y Paraiso), otro conformado por tres haplotipos (sc115A, sc115B y scPs1) de *B. scalariformis* y el último formado por haplotipos de *B. sordidus* (srStmd y srSt), incluyendo cinco individuos *B. sordidus* del Valle de Santa Eulalia y un *B. modestus* de las Lomas de Picapiedra (Figura 62).

El clado mdPiP-Par, aunque distante, se reveló más asociado al clado de los *B. sordidus*, que al clado mdMz-At, que podía esperarse ya que también contiene haplotipos de la especie *B. modestus*. En el caso de *B. sordidus* el haplotipo de las Lomas de Iguanil (srIg) queda más relacionado con aquiellos del valle de San Eulalia (srSt), que con el haplotipo el scPs2 (Figura 62).

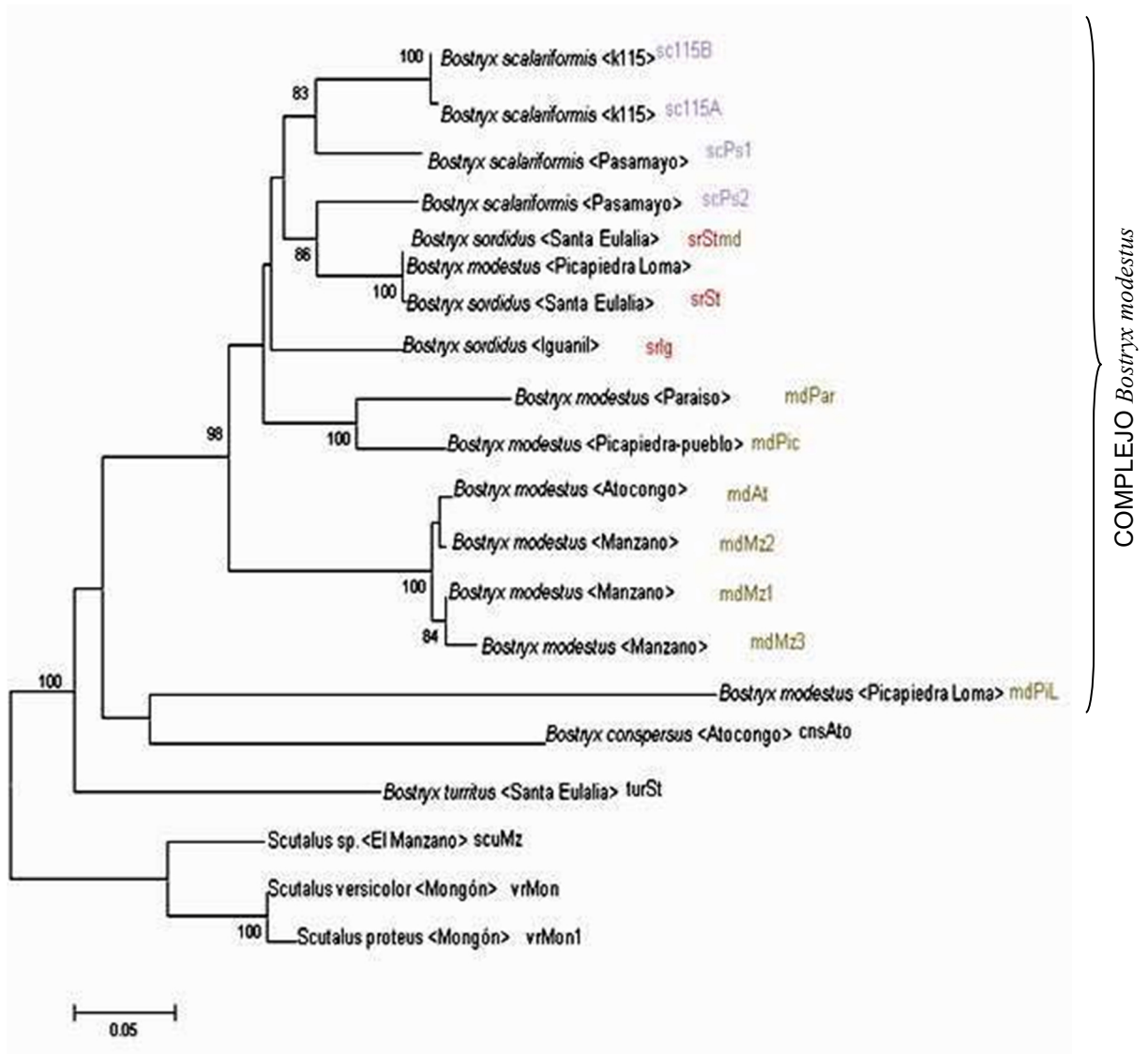


Figura 56. Árbol NJ para 14 haplotipos de COI del complejo *B. modestus* (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*) y cinco haplotipos de otros taxa. Se indican todos los valores de *bootstrap* \geq a 75%.

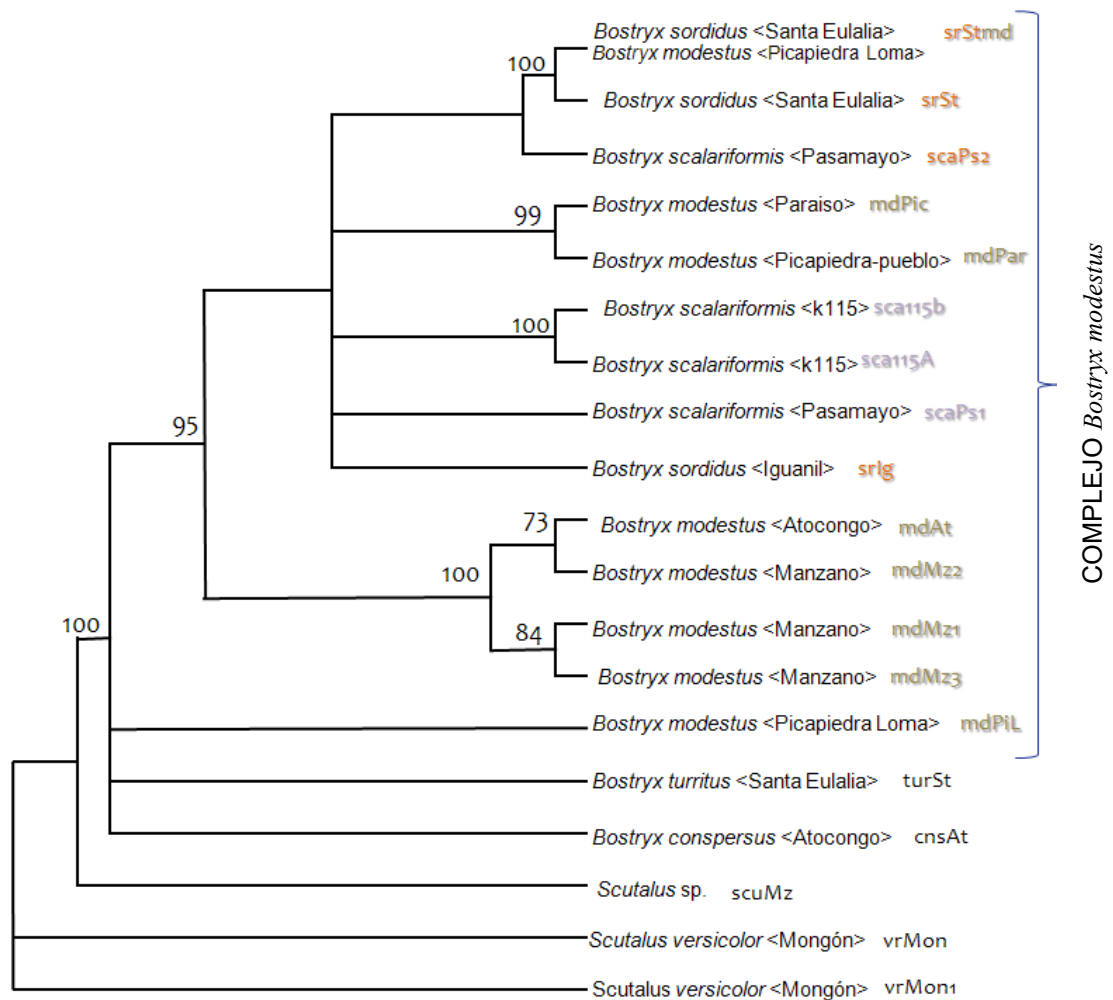


Figura 57. Árbol de MP para 14 haplotipos de COI del complejo de especies *Bostryx modestus* (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*) y 5 haplotipos de otros taxa. Se indican los valores de *bootstrap* \geq a 75%.

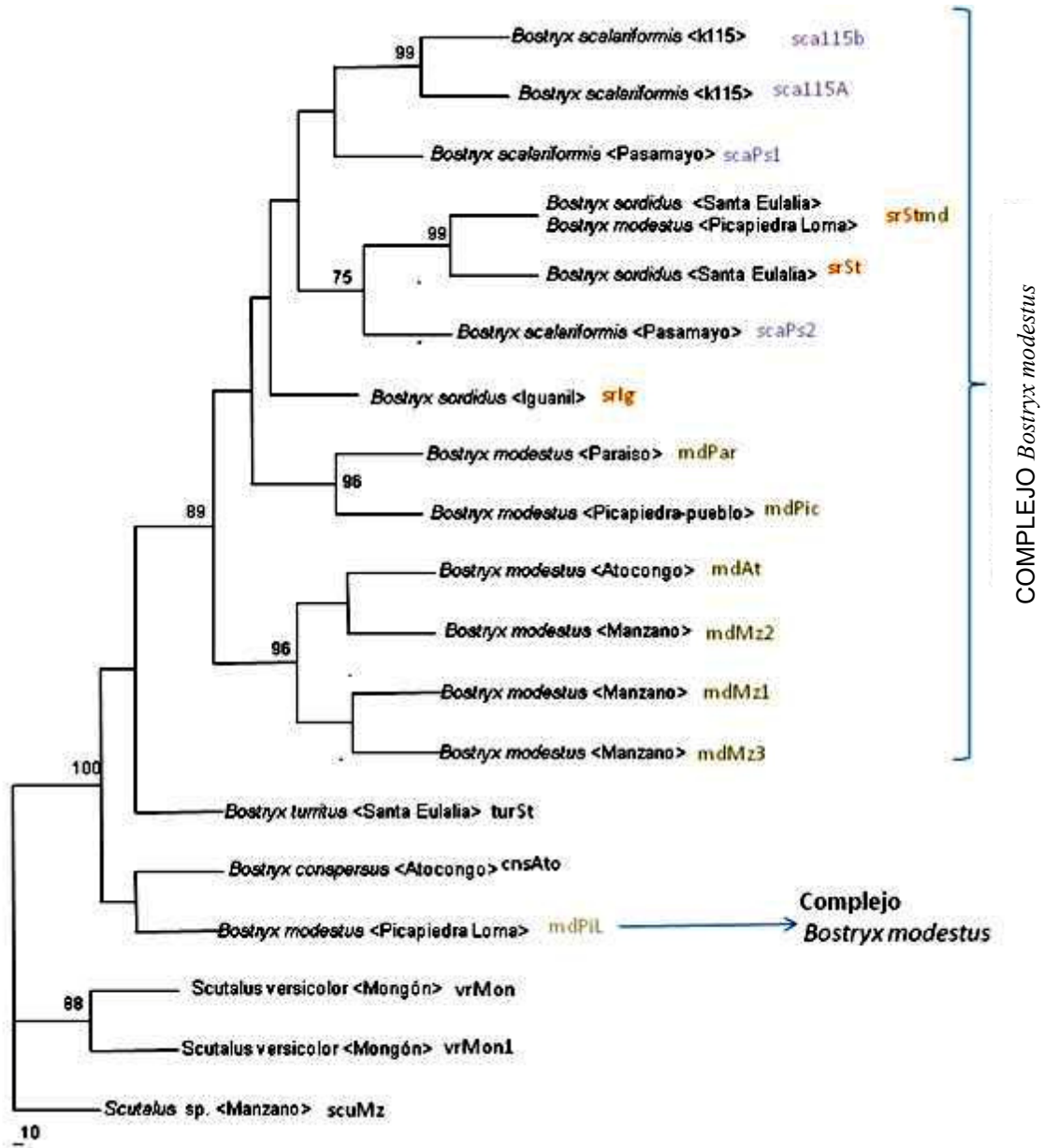


Figura 58. Árbol de ML para 14 haplotipos de COI del complejo *Bostryx modestus* (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*) y cinco haplotipos de otros taxa. Se indican los valores de *bootstrap* \geq a 75%.

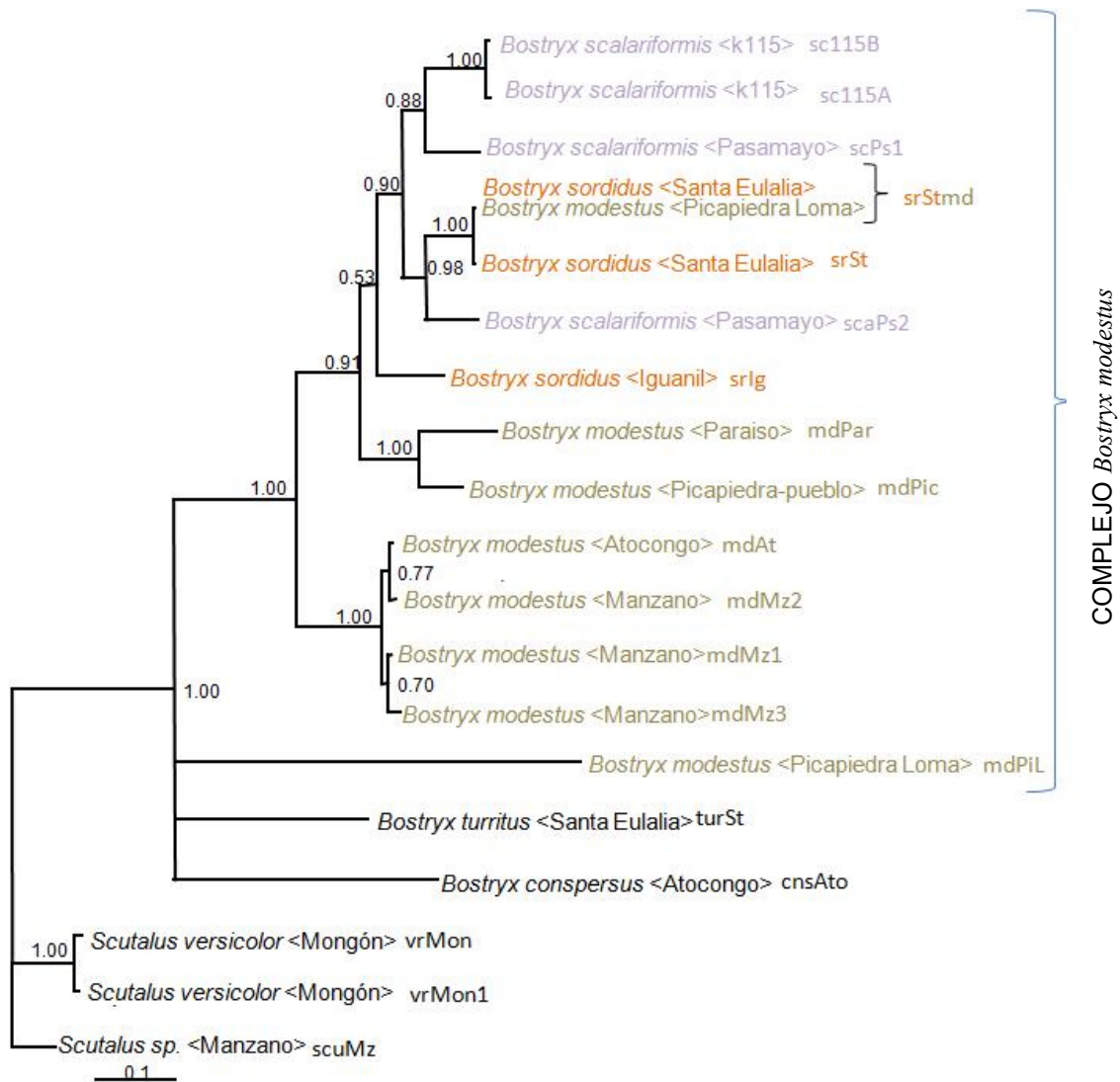


Figura 59. Árbol generado usando IB para 14 haplotipos de COI del complejo *Bostryx modestus* (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*) y cinco haplotipos de otros taxa. Se indican todos los valores de probabilidad posterior.

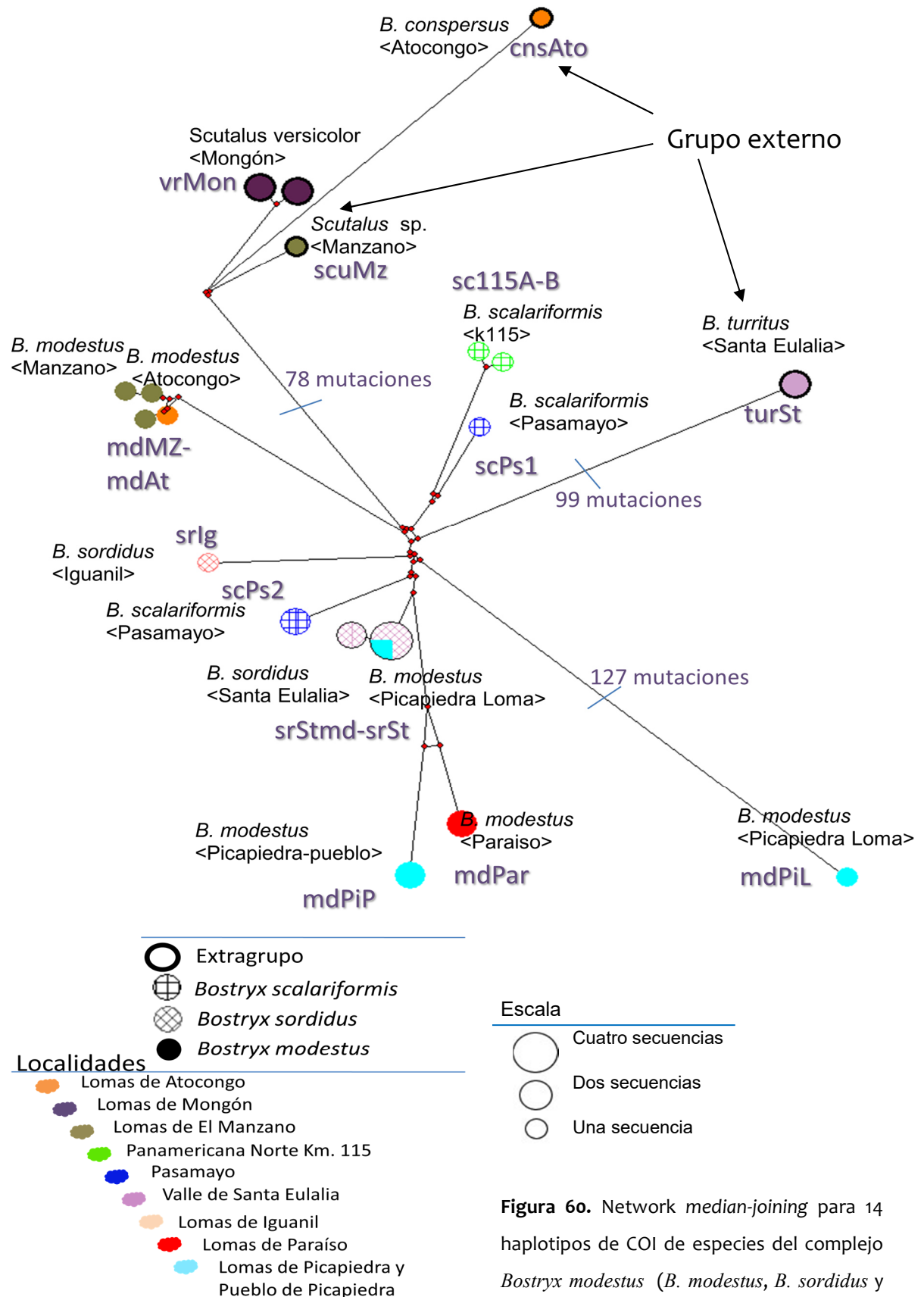
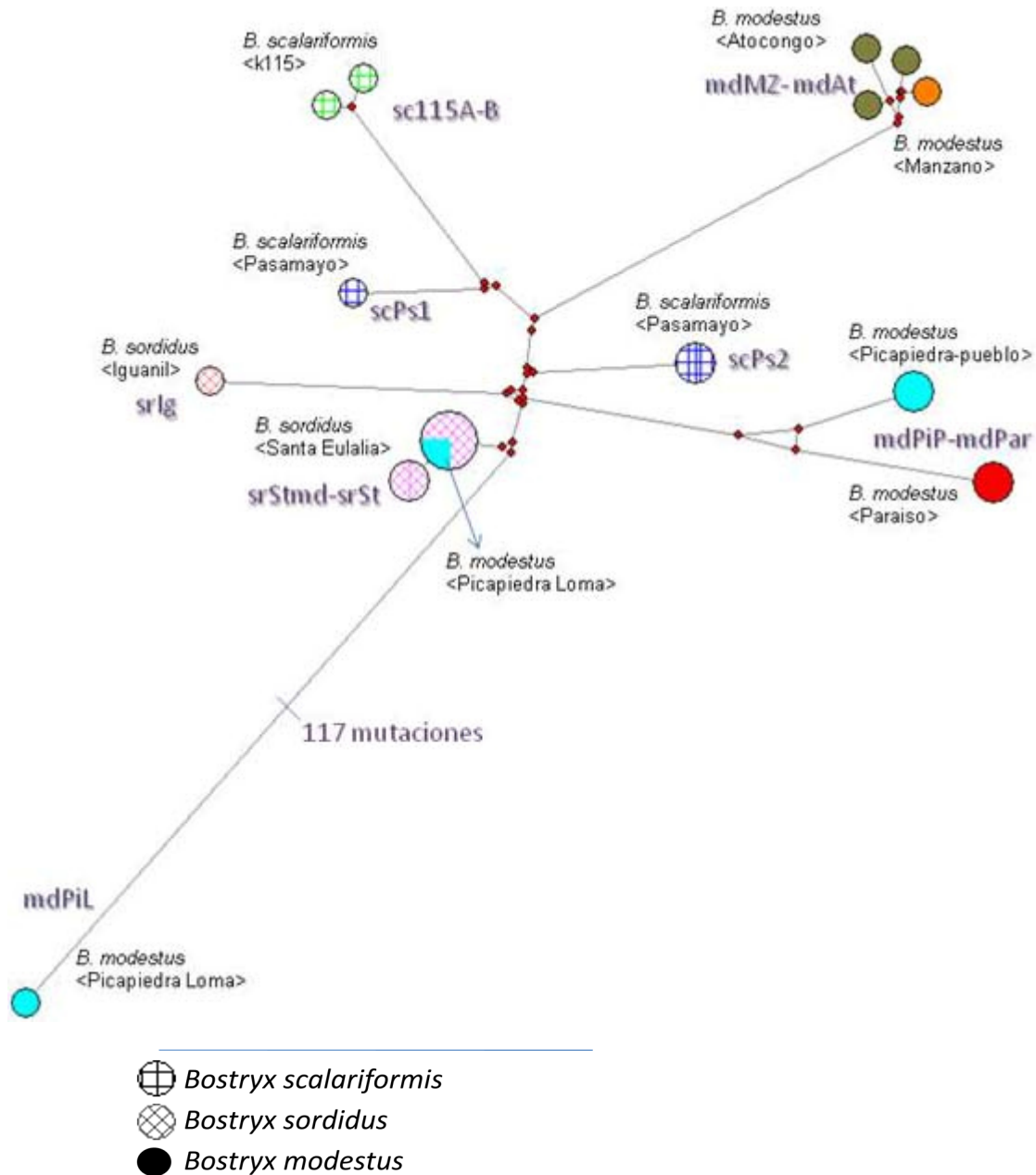


Figura 60. Network median-joining para 14 haplotipos de COI de especies del complejo *Bostryx modestus* (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*) y 5 haplotipos de especies del grupo externo.



Localidades

- Lomas de Atocongo
- Lomas de El Manzano
- Panamericana Norte Km. 115
- Pasamayo
- Valle de Santa Eulalia
- Lomas de Iguanil
- Lomas de Paraíso
- Lomas de Picapiedra y Pueblo de Picapiedra

Escala

- Cuatro secuencias
- Dos secuencias
- Una secuencia

Figura 61. Network median-joining para todos los 14 haplotipos de COI de especies del complejo *B. modestus* (*B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*).

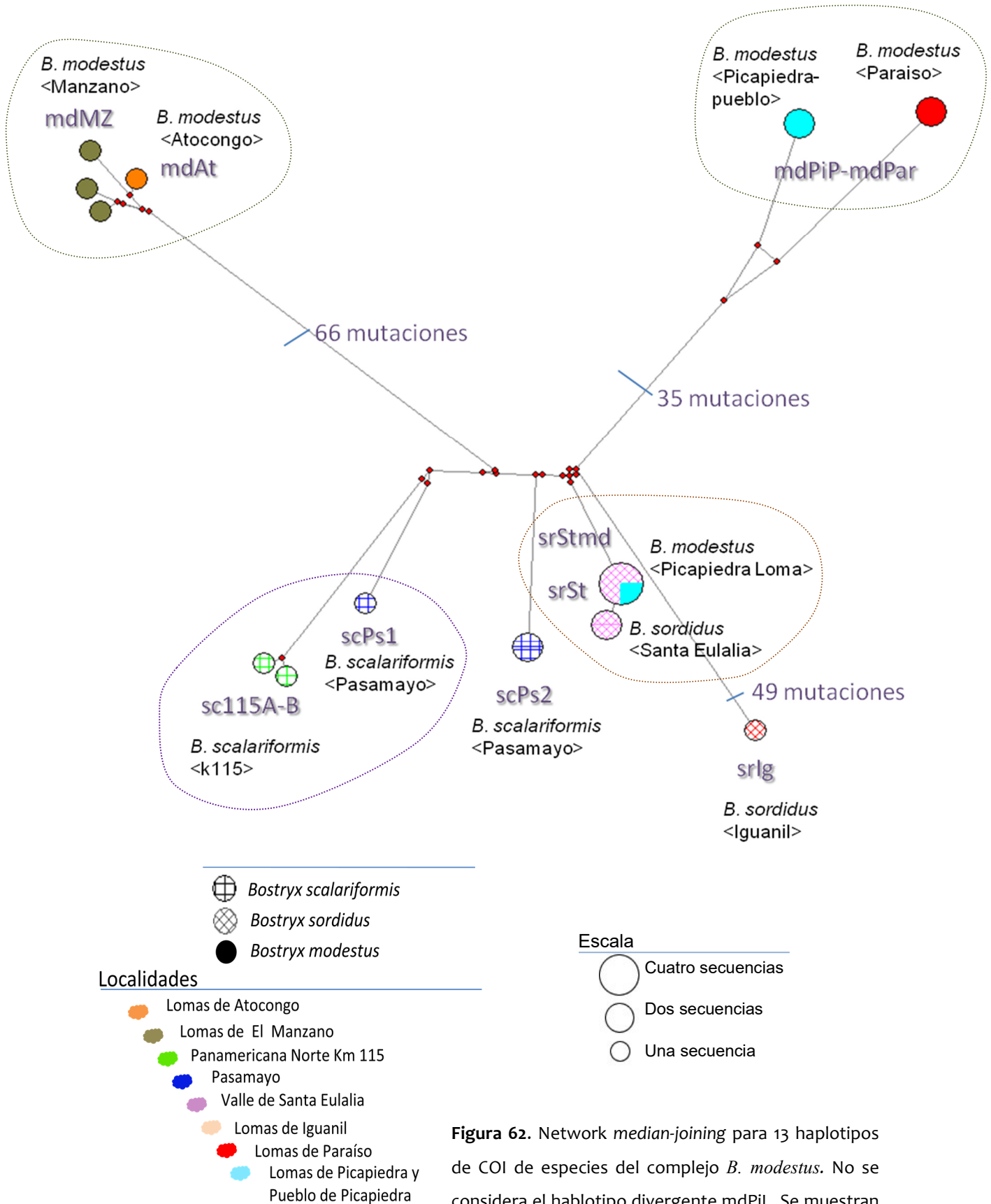


Figura 62. Network *median-joining* para 13 haplotipos de COI de especies del complejo *B. modestus*. No se considera el haplotipo divergente mdPiL. Se muestran los cuatro clados principales.

TIEMPO DE DIVERGENCIA

El tiempo estimado de divergencia de 13 de los 14 haplotipos que forman parte del complejo de especies *B. modestus*, usando el marcador mitocondrial COI, con tasas de sustitución de 0.084 mutaciones por sitio por millón de años en un árbol linearizado en el programa MEGA4.0, sugiere una antigüedad de 1.382 millones de años (**Figura 63**). Se observa también un periodo de reciente diversificación que se habría dado hace 144 – 3 mil años.

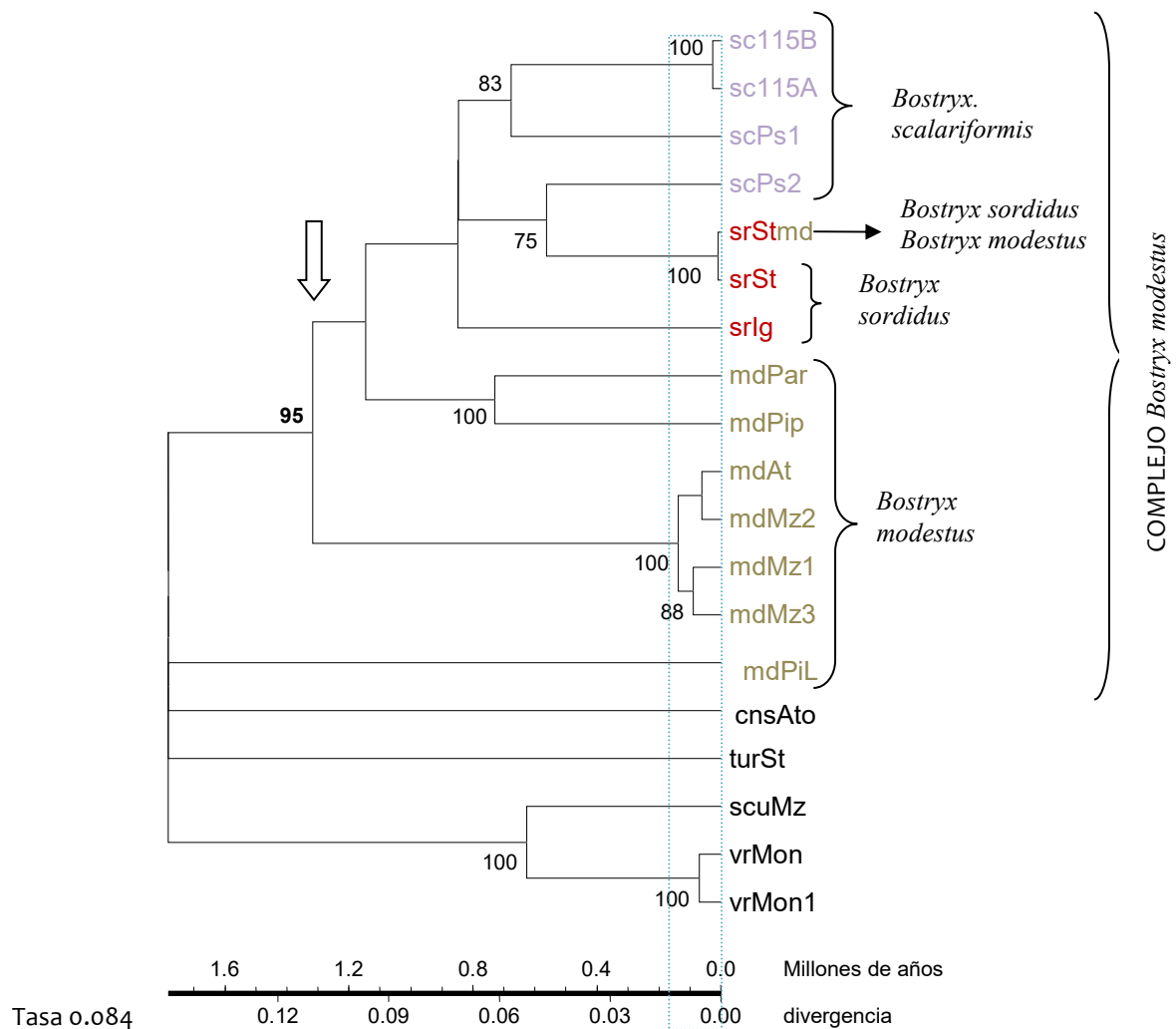


Figura 63. Árbol (NJ, con K-2p y $\alpha=0.33575$) linearizado para la obtención de tiempos de divergencia usando 0.084 de tasa de sustitución por sitio por año. Se observa el reciente periodo de diversificación hace 144 - 3 mil años (sección azul). Nótese que la diversificación del complejo de especies *B. modestus* se habría dado en el Pleistoceno hace 1.382 millones de años (flecha).

V. DISCUSIÓN

Actualmente existen 1.7 millones de especies descritas, sin embargo se estima que aún existen cerca de 8 millones de especies por descubrir (Stoeckle & Hebert, 2008). La iniciativa del *barcode of life*, mediante el uso del Citocromo C oxidasa I (COI), está intentando eliminar tal carencia de conocimiento. De todas las *phyla* existentes, el *phylum* mollusca es el segundo más diverso, después de los artrópodos (Simone, 2006). Sin embargo, actualmente se desconoce gran parte de su diversidad así como de sus relaciones evolutivas (Lydeard & Lindberg, 2003). El COI posee gran capacidad para reconocer especies (Ryan *et al.*, 2007; Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b), por lo que actualmente está siendo usado para la obtención de *barcodes* en lepidópteros (www.lepbarcoding.org), peces (www.fishbol.org), aves (www.barcodingbirds.org) y vida polar (www.polarbarcoding.org).

En el desierto de la costa peruana son predominantes las especies de moluscos terrestres del género *Bostryx*. Entre ellas destacan *Bostryx modestus*, *Bostryx sordidus* y *Bostryx scalariformis*. Dichas especies trabajadas con el marcador mitocondrial 16S rRNA, no formaron un grupo monofilético, posiblemente debido a una temprana diversificación, pasando a denominarse complejo de especies *B. modestus* [Ramírez, 2004]. Estas mismas especies se trabajaron aquí con el COI para dilucidar sus relaciones evolutivas en una esperada filogenia resuelta, así como para definir perfiles COI de las especies *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL COI EN COLECCIONES CIENTÍFICAS

Como primer paso en la obtención de secuencias de COI, se decidió hacer uso de especímenes de la colección científica del Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la UNMSM, usados en estudios moleculares previos. Lamentablemente, el éxito en la obtención de amplicones COI fue de muy bajo a nulo. Tal hecho se puede deber a la degradación del DNA producido por acidificación al ser almacenado por prolongados periodos de tiempo, sin reemplazar el alcohol o agregar *buffer* adecuado (Hajibabae *et al.*, 2006). Sin embargo, con el marcador 16S rRNA los amplicones fueron ligeramente más viables ya que son de menor tamaño (~350 pb) en comparación con el COI (~710pb), evidenciándose una mayor factibilidad de generar amplicones de menor tamaño en muestras con un grado severo de degradación (Goldstain & Desalle, 2003).

MONOFILIA DEL COMPLEJO DE ESPECIES *B. modestus*

En el análisis filogenético de las especies *Bostryx modestus*, *Bostryx sordidus* y *Bostryx scalariformis*, usando como grupo externo a las especies *B. turritus*, *B. conspersus* y *Scutalus* spp., no se consiguió determinar grupos monofiléticos por especie. Un estudio filogenético previo de estas mismas especies usando el marcador 16S rRNA dio resultados similares, lo que llevó a Ramírez (2004) a denominarlas “complejo de especies *Bostryx modestus*”. Si bien no se consiguió determinar grupos monofiléticos por especie, 13 de los 14 haplotipos del marcador COI de las especies *Bostryx modestus*, *Bostryx sordidus* y *Bostryx scalariformis* lograron agruparse en un clado monofilético fuertemente soportado, independiente de la metodología utilizada (Neighbour joining, Máxima parsimonia, *Maximum likelihood* e Inferencia Bayesiana). El haplotipo divergente (mdPiL) corresponde a un ejemplar de *B. modestus* de la localidad de Picapiedra (Provincia de Lima, Distrito de Pachacamac). Véase la discusión más adelante. Algo semejante fue observado al analizar las relaciones filogenéticas de dos especies de moluscos terrestres endémicos de la península ibérica (*Iberus gualtieranus* e *I. alonensis*), con identidades morfológicas pero sin una completa separación a nivel de su DNA mitocondrial (Elejalde *et al.*, 2008).

Neigel y Avise (1986) realizaron simulaciones de coalescencia para monitorear el estatus filogenético de poblaciones hijas. Considerando una distribución inicial al azar, antes de que los haplotipos lleguen a formar grupos monofiléticos, pasan por formar primero grupos polifiléticos y luego grupos parafiléticos. Por lo tanto, los grupos recíprocamente monofiléticos aparecen después de un tiempo prolongado, probablemente mayor a cuatro veces el número efectivo poblacional. El que las especies *Bostryx modestus*, *Bostryx sordidus* y *Bostryx scalariformis* tengan haplotipos polifiléticos, pero con morfologías diferenciales, indicaría que el origen de la diversificación que conllevó a la aparición de tales especies es relativamente reciente.

DIVERGENCIA DENTRO DEL COMPLEJO DE ESPECIES *B. modestus*

En la filogenia de las especies del complejo *B. modestus*, dentro del clado monofilético, se tienen dos subclados fuertemente sustentados (>75%), uno de los cuales contiene sólo haplotipos de *B. modestus* y el otro incluye haplotipos de las tres especies, *Bostryx modestus*, *Bostryx sordidus* y *Bostryx scalariformis*. Un haplotipo de *B. scalariformis* (scPs2) de la localidad de Pasamayo (Departamento de Lima, Provincia de Huaral, Distrito de Aucallama),

presente en dos individuos, es tan distante del clado de *B. scalariformis* como lo son haplotipos de otras especies. En los análisis filogenéticos, este haplotipo (scPs2) quedó más en relación a *B. sordidus*. Cabría la posibilidad de que los individuos de *B. scalariformis* de Pasamayo (scPs2), que se asociaron con *B. sordidus* correspondan a esta última especie. Sin embargo, por sus características morfológicas externas corresponderían a *B. scalariformis* (Figura 38 y 39). Por el contrario, asumiendo sobre la base del COI, que esos individuos divergentes de Pasamayo no pertenezcan a *B. scalariformis*, podría atribuirse a la capacidad de los moluscos terrestres a adaptarse a las variaciones de su ambiente (Chiba, 1999; 2003; Pfenninger et al 2006) y con ello llegar a una evolución convergente. Sin embargo, la explicación más plausible para las aparentes contradicciones entre DNA mitocondrial y morfología sería más bien al producto de una reciente diversificación morfológica, como ha sido planteado por Chiba (2002) para el caso del género *Mandarina* en el que se dio especiación ecológica y morfológica hace 1.8 Millones de años.

Caso similar acontece con un individuo de *Bostryx modestus* de las Lomas de Picapiedra (Figura 28) que comparte el haplotipo srStmd con tres *B. sordidus* de Santa Eulalia (Figuras 30, 31 y 33) siendo en apariencia evidentemente distinto a *B. sordidus*. En especies en las que la diferenciación morfológica se ha dado más rápidamente que la diferenciación genética, marcadores moleculares mitocondriales, libres de una marcada presión selectiva no logran diferenciar claramente los límites de las especies (Avice, 2000).

EXTREMA DIVERGENCIA EN EL COMPLEJO *B. modestus*

De los 14 haplotipos del complejo de especies *B. modestus*, una de ellas quedó extremadamente divergente, por fuera del clado comprendido por las especies *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*. El haplotipo de un *B. modestus* de las Lomas de Picapiedra (mdPiL) quedó aparentemente más en relación a los grupos externos. El haplotipo 16S rRNA del mismo individuo se mostró también muy divergente en una filogenia basado en el marcador 16S rRNA (Ramírez, comunicación personal), indicando ello que la peculiaridad de dicho ejemplar no se encuentra limitada a un gen en específico o a una mutación al azar, sino más bien es reflejo de su éxito al adaptarse al medio que habita.

Wilke *et al.* (2006), al observar casos inusuales de variación genética intraespecífica en el caso del gastrópodo acuático *Oncomelania hupensis robertsoni*, sugieren, entre otras, cinco posibles razones: (1) presencia de especies crípticas, (2) presencia de copias nucleares de

genes mitocondriales, (3) heteroplasma, (4) aislamiento temporal seguido de contacto secundario y (5) retención de polimorfismo ancestral. Los estudios anatómicos y moleculares realizados hasta el momento no dan indicios de posibles especies crípticas (Ramírez, 2004). Además, el tener una única secuencia ultra divergente dentro de una misma localidad hace improbable que se trate de una especie críptica, aunque para descartar totalmente esta posibilidad harían falta más estudios usando caracteres no morfológicos (Bickford *et al.*, 2006). En el caso de que fuera producto de copias nucleares de genes mitocondriales, esto habría sido detectado por la presencia de bandas fantasma en el gel o por ambigüedad en la lectura de las secuencias producto de cambios en el marco de lectura o codones de parada (Bensasson *et al.*, 2001). Wilke *et al.* (2006) postulan la heteroplasma como una posible explicación, ya que en algunos casos pueden darse diferentes formas estructurales mitocondriales en individuos que se adaptan a microhabitats diferenciados, lo cual no es el caso aquí, ya que el individuo con haplotipo altamente divergente se encuentra en el mismo ambiente que el resto de individuos de *B. modestus* de Picapiedra. Las posibilidades de que se haya dado contacto secundario surgen en otras especies con orígenes en el Mioceno (Thomaz *et al.*, 1996), en el caso de *B. modestus* no se habría dado suficiente tiempo de separación como para generar tal tipo de variación (véase discusión mas adelante). Las especies con baja vagilidad tienden a mantenerse aisladas en demos, y por ende son las más propensas a conservar polimorfismos ancestrales (Thomaz *et al.*, 1996). En el caso del pulmonado terrestre del viejo mundo *Cepaea nemoralis*, Thomaz *et al.* (1996) encuentran que tal divergencia es comparable con otras especies, incluso hasta a nivel de orden.

En la literatura se tienen casos en los que dos secuencias muy divergentes llegan a atraerse al margen de su historia evolutiva (Grande *et al.*, 2008), esto se conoce como *long branch attraction* (LBA). Bergsten (2005) analizó esta situación y encontró que estos casos se daban muy frecuentemente en filogenias inferidas en base a máxima parsimonia (MP) y en menor grado en casos de Inferencia Bayesiana (IB). En este trabajo al hacer el análisis filogenético de los haplotipos en base a cuatro metodologías distintas (NJ, MP, ML e IB) no se encontró diferencia alguna en cuanto a la ubicación del haplotipo extremadamente divergente mdPiL, reforzándose la idea de que no se trataría de un caso de LBA, sino más bien de un polimorfismo ancestral.

HISTORIA EVOLUTIVA DEL COMPLEJO DE ESPECIES *B. modestus*

Los haplotipos del marcador mitocondrial COI de las especies de *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis* no se encuentran formando grupos recíprocamente monofiléticos, probablemente debido a una reciente diversificación (Ramírez, 2004), en comparación con *B. turritus*, *B. conspersus* y *Scutalus* spp.. Infiriendo el tiempo de diversificación con el marcador COI para el complejo de especies *B. modestus* se encuentra que habría sido hace 1,382 millones de años, un tiempo semejante resultó al ser calculado el tiempo de divergencia mediante el marcador 16S rRNA (Ramírez, 2004). Avise (2000), después de hacer una revisión en la diversificación molecular en aves, mamíferos y otras especies de vertebrados, concluye que tal divergencia se dio hace aproximadamente 2 millones de años, en el Pleistoceno. Por otro lado, hay reportes en la literatura de casos como el encontrado para el complejo de especies *B. modestus*, con diversificación en el Pleistoceno pero que aún no presentan grupos recíprocamente monofiléticos, como por ejemplo los caracoles marinos conocidos como bígaros, *Littorina arcana*, *L. compressa* y *L. saxatilis*, que son especies identificables morfológicamente pero sin una completa separación a nivel de DNA mitocondrial (Wilding *et al.*, 2000).

El origen de los haplotipos actuales del complejo de especies *B. modestus* se remonta a apenas 144 – 3 mil años, diferenciables por escasas mutaciones, dando una topología conocida con el nombre de “árbol en estrella” (Figura 62 – 63), topología que es marca indiscutible de un cuello de botella genético seguido de un súbito crecimiento poblacional con expansión demográfica (Avise, 2000).

El que las poblaciones en el pasado hayan sido sometidas a condiciones extremadamente adversas en el desierto de la costa del Perú, no es difícil de imaginar. Las poblaciones de moluscos terrestres tienen actividad estacional permaneciendo activos en invierno (época húmeda) y estivando en el verano (época seca). Existen además otras variaciones climáticas que afectan el desierto costero, El Niño/Oscilación Sur y La Niña. Ramírez *et al.* (1999) y Ramírez *et al.* (2003) observaron que las poblaciones de moluscos durante El Niño/Oscilación Sur prolongan su actividad durante todo el año (ausencia de estiviación) incrementando su tamaño poblacional, sucediendo lo contrario durante eventos de La Niña, en los que las poblaciones de moluscos son disminuidas drásticamente a causa de la sequedad ambiental extrema. Durante el Pleistoceno se dieron las últimas glaciaciones, entre estos periodos glaciales hubo intervalos de clima más cálido

denominados interglaciales. Así, las glaciaciones llevarían a disminuir la variabilidad, mas posterior a ello se tendrían periodos de abundancia que favorecerían la colonización de nuevos refugios favorables para la reproducción, como fue sugerido en especies de moluscos terrestres europeos (Guiller A. *et al.*, 2001; Pfenninger & Posada, 2002; Pfenninger *et al.*, 2003). Durante el Pleistoceno se dieron además eventos El Niño/Oscilación Sur extraordinarios (Hughen *et al.*, 1999), que habrían permitido una extensión de las Lomas mayor de la que se tiene actualmente contribuyendo a la recuperación de las poblaciones de moluscos terrestres cuya diversificación genética se visualizaría en la actualidad con la topología de “árbol en estrella”, como lo fue observado con el marcador mitocondrial 16S rRNA (Ramírez, 2004). Si bien el marcador COI no permitió discernir a las especies del complejo *B. modestus*, sí genera una filogenia con topología de “árbol en estrella”, lo que sería la huella dejada por los paleo-cambios climáticos ocurridos en la región.

¿PERFILES COI PARA *B. modestus*, *B. sordidus* Y *B. scalariformis*?

El Consorcio para el Código de Barras de la vida (*Consortium for the Barcode of Life*), posee una plataforma de información *online* que ayuda a la colección, manejo, análisis y uso de los *barcodes* (www.barcodinglife.org/views/login.php). Entre los requisitos necesarios para validar un *barcode* se tiene: (1) indexar al menos tres secuencias de distintos individuos de 500 pb como mínimo y (2) con una divergencia no mayor a 2 %, analizado según el modelo de sustitución nucleotídica Kimura dos parámetros (www.boldsystems.org/views/idrequest.php).

La gran capacidad del COI para identificar especies animales llevó a Hebert *et al.* (2003a) a proponerlo como base para el proyecto del código de barras de la vida. Usando este marcador en el análisis filogenético de las especies *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*, no fue posible determinar perfiles COI para cada una de estas especies, ya que tampoco se consiguió determinar grupos monofiléticos por especie. En el caso de moluscos, Mikkelsen *et al.* (2007), usando el COI en los géneros *Ennucula*, *Nucula*, *Yodiella* y *Thyasira*, lograron reconocerlas exitosamente, tanto a nivel de género como de especie. Sin embargo, para el caso del complejo de especies *B. modestus* no se logró resolver la identidad de cada una de las especies debido probablemente a una reciente diversificación más que por carencia de sensibilidad de este marcador.

La costa peruana a pesar de poseer uno de los desiertos más drásticos del mundo, en donde se presumiría difícil encontrar diversificación, alberga gran diversidad de ecosistemas, especies y genes. Estudios moleculares desarrollados recientemente están encontrando peculiares e inesperadas situaciones. En *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis* se habría dado una diferenciación morfológica y ecológica mucho más rápidamente que la diferenciación genética, evidenciada por marcadores moleculares mitocondriales, como el COI aquí estudiado. Las especies de distribución restringida, especialmente moluscos terrestres, conservan en sus genomas marcas ancestrales de paleoeventos acontecidos en sus hábitats naturales. mantener los procesos ecológicos esenciales de los que depende la supervivencia de las especies que los habitan, debería ser prioritario.

VI. CONCLUSIONES

1. Los haplotipos COI de *Bostryx modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis* no forman grupos monofiléticos por especie, pero están más cercanamente relacionados entre ellos, que con los de otras especies de moluscos terrestres de las lomas de la costa central del Perú.
2. *Bostryx modestus* presenta un haplotipo COI ancestral, inclusive a *B. scalariformis* y *B. sordidus*, que ha sobrevivido hasta la actualidad.
3. Existe una gran divergencia entre los haplotipos que presentan las especies *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis*, no concordante con la morfología de los individuos que los portan.
4. Las especies *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis* son de reciente diversificación, muy probablemente ocurrida durante el Pleistoceno, fecha reciente en comparación con *B. turritus*, *B. conspersus* y *Scutalus* spp.
5. La reciente diversificación de *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis* ha sido insuficiente para generar haplotipos COI recíprocamente monofiléticos, apoyando la designación de “complejo de especies *Bostryx modestus*”.
6. *B. modestus*, *B. sordidus* y *B. scalariformis* son especies cercanamente relacionadas, diferenciables morfológicamente, para las cuales no es posible obtener “códigos de barras de DNA” basados la citocromo C oxidasa I, debido a su reciente diversificación que no ha permitido la acumulación de suficiente variación como para que los haplotipos COI sean monofiléticos por especie.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar P. & J. Arrarte. 1974. Moluscos de las Lomas costeras del Perú. Anales Científicos, Universidad Nacional Agraria. Perú 12(3-4): 93-98.

Aguilar P. 1985. Fauna de las Lomas costeras del Perú. Boletín de Lima (Perú). 41:17-28.

All Birds Barcode Initiative. www.barcodingbirds.org

All Leps Barcode of Life. www.lepbarcoding.org

Avice J. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press. Cambridge, MA.

Avice J. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. 2 ed. Chapman & Hall, New York.

Avice J., Arnold J., Ball R., Bermingham E., Lamb T., Niegel J., Reeb C. & N. Saunders. 1987. Intraespecific phylogeography: the Mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics. 18: 489-522.

Bandelt H-J, P. Forster & A. Röhl .1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol. 16:37- 48.

Barcode of Life Initiative. www.dnabarcodes.org

Barcode of Life. www.barcodinglife.org/views/login.php

Bensasson B., D.-X Zang, D. Hartl & G. Hewitt. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. Trends in Ecology and Evolution. 16: 314 - 321.

Bergsten, J. 2005. A review of long-branch attraction. Cladistics. 21 (2): 163-193.

Bickford D., D. Lohman, N. Sodhi, P. Ng., R. Meier, K. Winker, K. Ingram & I. Das. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. TRENDS in Ecology and Evolution. 22(3): 148 -155.

Bonett R., J. Robert, J. Boore & P. Chippindale. 2004. Resolving the tips of the Tree of Life: How much mitochondrial data do we need? Lawrence Berkeley National Laboratory. Paper LBNL-55130. www.osti.gov/energycitations/servlets/purl/878682-

HpQCIm/878682.PDF

CBOL.www.barcoding.si.edu/PDF/CBOL-ABS%20Brochure%20-%20FINAL.pdf

Chiba S. 2002. Ecological diversity and speciation in land snails of the genus *Mandarina* from the Bonin Islands. *Population Ecology*. 44: 179-187.

Chiba S. 1999. Character displacement frequency-dependent selection and divergence of shell color in land snails *Mandarina* (Pulmonat). *Biological Journal of the Linnean Society*. 66:465-479.

Chiba S. 2003. Species Diversity and Conservation of *Mandarina*, an Endemic Land Snail of the Ogasawara Islands. *Global Environmental Research*. 7:29-37.

Coltrinaro L. 1993. Global Quaternary changes in South America. *Global and Planetary Change*. 7: 11-23.

Convenio de Diversidad Biológica. www.cbd.int/doc/legal/cbd-un-en.pdf

Davison A. & S. Chiba. 2006. Labile ecotypes accompany rapid cladogenesis in an adaptive radiation of *Mandarina* (Bradybaenidae) land snails. *Biological Journal of the Linnean Society*. 88: 269-282.

Dean M. & J. Ballard. 2004. Linking phylogenetics with population genetics to reconstruct the geographic origin of species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32: 998-1009.

Dillon M. 1997. Lomas Formations Peru. In: Davis S., V. Heywood, O. Herrera-MacBryde, J. Villa-Lobos & A. Hamilton (eds): *Centres of Plants Diversity. Volume 3*. The World Wide Fund For Nature (WWF) and IUCN- The World Conservation Union. Cambridge, U.K. pp. 519-527.

Doyle & Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19:11-15.

Elejalde M., M. Madeira, J. Arrébola, B. Muñoz & B. Gómez-Moliner. 2008. Molecular phylogeny, taxonomy and evolution of the land snail genus *Iberus* (Pulmonata: Helicidae). *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research*. 46(3): 193-202.

- Engel F. 1970. Las Lomas de Iguanil y el Complejo de Hadas. Universidad Nacional Agraria, Lima, Perú.
- Engel F. 1987. De las begonias al maíz, vida y producción en el Perú Antiguo. Centro de Investigaciones de Zonas Áridas (CIZA), Universidad Nacional Agraria, La Molina, Lima, Perú.
- Excoffier L, G. Laval & S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 1:47–50.
- Fish Barcode of Life Initiative (FISH-BOL).www.fishbol.org
- Fitch W. & E. Margoliash. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science*. 155:279-284.
- Folmer O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5): 294-299.
- Geenen S., K. Jordaens & T. Backeljau. 2006. Molecular systematics of the Carinarion complex (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) : a taxonomic riddle caused by a mixed breeding system. *Biological Journal of the Linnean Society*. 89(4): 589-604.
- Gittenberger A. & E. Gittenberger. 2006. A largely cryptic, adaptive radiation of parasitic snails: sibling species in *Leptoconchus* (Gastropoda: Caenogastropoda: Coralliophilidae), associated with specific coral hosts (Scleractinia: Fungiidae). In: The evolutionary history of parasitic gastropods and their coral hosts in the Indo-Pacific. <http://hdl.handle.net/1887/5415>
- Gould S. 1969. An evolutionary microsm: Pleistocene and recent history of the land snail *P. (Poecilozonites)* in Bermuda. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*. 138(7), 1-531.
- Graham G., P. Mayers & R. Henry. 1994. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *BioTechnique* 16:48–50.
- Green, P. 1995. Reversible jump Markov chain Monte Carlo computation and Bayesian model

- determination. *Biometrika*. 82: 711–732.
- Guiller A., A. Coutellec-Vreto, L. Madec & J. Deunff. 2001. Evolutionary History of the land snail *Helix aspersa* in the western mediterranean: preliminary results inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*. 10: 81 - 87.
- Hajibabaei M., S. Smith, D. Janzen, J. Rodrigues, J. Whitfield & P. Hebert. 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*. 6: 956-964.
- Hastings, W. 1970. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika*. 57: 97–109.
- Hausdorf B. & C. Henning. 2005. The influence of recent geography, palaeogeography and climate on the composition of the fauna of the central Aegean Islands. *Biological Journal of the Linnean Society*. 84: 785–795.
- Hebert P., A. Cywinska, S. Ball & J. deWard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Royal Soc Lond*. 270: 313-322.
- Herbert P, S. Ratnasingham & J. deWaard. 2003b. Barcoding animal Life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*. 270: S96 – S99.
- Hillis D., C. Moritz & B. Mable (eds.). 1996. *Molecular Systematics*. 2 ed. Sinauer Associates, Inc. USA.
- Holder M. & P. Lewis. 2003. Phylogeny Estimation: Traditional and Bayesian Approaches. *Nature Reviews Genetics*. 4: 275 – 283.
- Holland B. & M. Hadfield. 2002. Islands within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Molecular Ecology*. 11: 365-375.
- Huang, X. and Madan, A. 1999. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research*. 9: 868-877.

- Huelsenbeck J., B. Larget, R. Miller & F. Ronquist. 2002. Potential Applications and Pitfalls of Bayesian Inference of Phylogeny. *Systematic Biologist*. 51(5):673-688.
- Hughen K., D. Schrag, S. Jacobsen & W. Hantoro. 1999. El niño during the last interglacial period recorded by a fossil coral from Indonesia. *Geophysical Research Letters*. 26 (20): 3129- 3132.
- Kumar S, Dudley J, Nei M & Tamura K (2008) MEGA: A biologist -centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 9: 299-306.
- Kumar S., K. Tamura & M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5: 150-163.
- Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., McWilliam H., Valentin F., Wallace I., Wilm A., Lopez R., Thompson J., Gibson T. & D. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23:2947-2948.
- Li W. 1997. *Molecular evolution*. 1ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Lidicker W. 1995. The enviromental spirit. Past, Present & Prospects. In: Keilch, J. (ed): Symposium & conference University of California, Berkeley Marking the 25th Anniversary of Earth Day. pp. 89-97.
- Lydeard C. & D. Lindberg. 2003. *Molecular Systematics and Phylogeography of Mollusks*. Smithsonian Institution.
- MACROGEN USA. www.macrogenusa.com/company/aboutus.jsp
- Mau B. & M. Newton. 1997. Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *Journal of computational and Graphical Statistics*. 6:122-131.
- Mau B. 1996. Bayesian phylogenetic inference via Markov chains Monte Carlo methods. Ph. D. Dissertation, University of Winsconsin, Madison. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 45: 792-812.

- Mau B., M. Newton & B. Larget. 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics*. 55:1-12.
- McCarthy C. 1996. Chromas: version 1.3. Griffith University, Brisbane, Australia.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A., Rosenbluth, M., Teller, A. & E. Teller. 1953. Equations of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.* 21: 1087–1091.
- Mikkelsen N., Schander C. & E. Willassen. 2007. Local scale DNA barcoding of bivalves (Mollusca): a case study. *Zoologica Scripta*. 36(5):455-463.
- Mortimer C., 1973, The Cenozoic history of the southern Atacama Desert, Chile. *Journal of the Geological Society of London* 129: 505–526.
- Nei M. & S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Inc.
- Neigel J. & J. Avise. 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In *Evolutionary Processes and Theory*, E. Nevo and S. Karlin (eds.). New York: Academic Press, pp.515 - 534.
- Networks, manual del usuario. www.fluxus-engineering.com/Network4501_user_guide.pdf
- NETWORKS. www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Ono M. 1986. Definition, classification and taxonomic significance of Lomas vegetation. In: M. Ono (ed): *Taxonomic and Ecological Studies on the Lomas vegetation in the Pacific Coast of Peru*. Reports for Overseas Scientific Survey. Makino Herbarium, Tokyo Metropolitan University. pp.5-14.
- Page R. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 12: 357-358.
- Pfenniger M. & D. Posada. 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula*

- unifasciata* (Poiret, 1801) (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation corridor migration and secondary contact. *Evolution*. 56: 1776 - 1788
- Pfenninger M., D. Posada & F. Magnin. 2003. Evidence for survival of Pleistocene climatic changes in Northern refugia by the land snail *Trochoidea geyeri* (Soós 1926) (Helicellinae, Stylommatophora). *Evolutionary Biology*. 3:8.
- Pfenninger M., M. Cordellier & B. Streit. 2006. Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gasteropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). *Evolutionary Biology*. 6:100.
- Pinche C. 1994. Estudio de las condiciones climáticas y de la niebla en la costa norte de Lima. *Boletín de Lima* 16(91-96): 39-43.
- Plataforma online de barcodes. www.boldsystems.org/views/idrequest.php
- Polar Barcode of Life. www.polarbarcoding.org/
- Posada D. & K. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14(9): 817-818.
- Ramírez R. 2004. Sistemática e Filogeografía dos Moluscos do Ecosistema de “Lomas” do Deserto da Costa Central do Peru. Tese do Doutorado em Zoologia. Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências.
- Ramírez R., J. Thome, D. Susanibar, N. Medina, & S. Córdova. 2001. O crescimento da cidade e o desaparecimento das populações de moluscos terrestres dos ecossistemas de neblina na costa de Lima (Peru). In: V Congreso de Ecología do Brasil, UFRGS, Porto Alegre, RS, 04 a 09 novembro. Resumos, p. 251.
- Ramírez R., K. Caro, S. Córdova, J. Duárez, A. Cano, C. Arana & J. Roque. 1999. Respuesta de *Bostryx conspersus* y *Succinea peruviana* (Mollusca, gastropoda). *Revista Peruana de Biología*. 143-151.
- Ramírez R., S. Córdova, K. Caro & J. Duárez. 2003. Response of a land snail species (*Bostryx conspersus*) in the Peruvian central coast Lomas ecosystem to the 1982-1983 and 1997-1998 El Niño events. *Fieldiana* 43: 10-23.

- Ramírez, R., S. Córdova, K. Caro & J. Duárez. 2003. Response of a land snail species (*Bostryx conspersus*) in the Peruvian central coast Lomas ecosystem to the 1982-1983 and 1997-1998 El Niño events. *Fieldiana*, 43: 10 – 23.
- Rannala B. & Z. Yang. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal Molecular Evolution*. 142:485-501.
- Rodríguez-Robles, J. A., G. R. Stewart, and T. J. Papenfuss. 2001. Mitochondrial DNA-based phylogeography of North American Rubber Boas, *Charina bottae* (Serpentes: Boidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18(2): 227 - 237.
- Ronquist, F. & J. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572–1574.
- Rozas J., J. Sanchez-Del Barrio, X. Messeguer & R. Rozas. 2003. DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rundel P., M. Dillon, B. Palma, H. Mooney, S. Gulmon & J. Ehleringer. 1990. The Phytogeography and Ecology of the Coastal Atacama and Peruvian Deserts. *Aliso* 13(1): 1-50.
- Rundell R., B. Holland & R. Cowie. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of the endemic *Hawaiian Succineidae* (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 246-255.
- Ryan P., Indra N., Douglas J. & R. Desalle. 2007. DNA barcoding using chitons (genus *Mopalia*). *Molecular Ecology Notes*. 7(2):177-183.
- Saiki R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharfj, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis & H. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487–91
- Sanger F., Nicklen S., & A. Coulson. 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the Natural Academy of Science (US)*. 74(12): 5463–5467.
- Simone, L. 2006. Land and Freshwater Molluscs of Brazil. *Museu de Zoologia Universidade*

de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Stoeckle M. & P. Hebert. 2008. Barcode of Life: Inspired by commercial barcodes, DNA tags could provide a quick, inexpensive way to identify species. *Scientific American*. pp. 82 - 88.

Stoeckle M., D. Janzen, W. Hallwachs, J. Hanken, J. Backer. 2003. Taxonomy, DNA and the Barcode of Life. Meeting held at Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY. September 10-12, 2003. <http://barcoding.si.edu/PDF/Banbury2Report.pdf>

Stoeckle M., P. Waggoner & J. Ausubel. 2005. *Barcoding Life, Illustrated*. <http://barcoding.si.edu/PDF/BLIllustrated26jan04v1-3.pdf>

Swofford D. 1998. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b8a. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

Takezaki N, Rzhetsky A & M. Nei. 2004. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Molecular Biology and Evolution* 21:823-833.

Tamura K, Dudley J, Nei M. & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

Thomaz D., A. Guiller & B. Clarke. 1996. Extreme divergence of mitochondrial DNA within species of pulmonate land snails. *Proceedings of the Royal Society B*. 263: 363 - 368.

Thompson J., Gibson T., Plewniak F., Jeanmougin F. & D. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25:4876-4882.

Tripodi A., J. Austin, A. Szalanski, Jackie Mckern, M. Carroll, R. Saran & M. Messenger. 2006. Phylogeography of *Reticulitermes termites* (Isoptera: Rhinotermitidae) in California inferred from Mitochondrial DNA sequences. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99(4):697-706.

Van Riel P., K. Jordaens, N. Van Houtte, A. Frias, R. Verhagen & T. Backeljau. 2005. Molecular Phylogenetics and Evolution. 37: 132-143.

Weyrauch, W. & P. Coronado. 1958. Lugares en las cercanías de Lima, más apropiados para

las excursiones de Ciencias Biológicas, con alumnos de Educación Secundaria. 1 ed.
Ministerio de Pesquería y Minería, Lima.

Wilke T., G. Davis, D. Qiu & R. Spear. 2006. Extreme mitochondrial sequence diversity in the
intermediate schistosomiasis host *Oncomelania - hupensis robertsoni*: Another case of
ancestral Polymorphism?. *Malacologia*. 48(1-2): 143 - 157.

CBOL.www.barcoding.si.edu/PDF/CBOL-ABS%20Brochure%20-%20FINAL.pdf

Xia X. & Z. Xie. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of
Heredity*. 92: 371-373.